Antikörper gegen synthetische Peptide als Sonden für die Struktur des Lactose:H^+-Carriers aus Escherichia coli

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Robert Seckler

aus Baden-Baden

1984

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536517_0041

Antikörper gegen synthetische Peptide als Sonden für die Struktur des Lactose:H^+-Carriers aus Escherichia coli

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Robert Seckler

aus Baden-Baden

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 8.11.84

Dekan : Prof.Dr. K.-A.Kovar
1.Berichterstatter : Prof.Dr. P.Overath
2.Berichterstatter : Prof.Dr. D.Mecke

A B S T R A C T

SECKLER, ROBERT :

ANTIKÖRPER GEGEN SYNTHETISCHE PEPTIDE ALS SONDEN FÜR DIE STRUKTUR DES LACTOSE:H^+-CARRIERS AUS *ESCHERICHIA COLI*

Antikörper gegen fünf, aus der Aminosäuresequenz des Lactose:H^+-Carriers ausgewählte chemisch synthetisierte Peptide mit 9-13 Aminosäureresten werden auf ihre Reaktivität mit dem Carrier untersucht.

Dabei zeigen Antiseren gegen das C-terminale Decapeptid des Proteins eine starke und spezifische Reaktion mit dem Carrier in Immunoblot und Immunpräzipitation, ebenso wie mit dem nativen, in die Cytoplasmamembran eingebauten Protein. Mit Hilfe dieser Antikörper wird der C-Terminus des Carriers auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert und gezeigt, daß das Transportprotein bei der Rekonstitution in Proteoliposomen in beiden Orientierungen eingebaut wird. Methoden zur immunchemischen Quantifizierung des Carriers auch in Mutanten werden beschrieben. Darüber hinaus wird gezeigt, daß der C-Terminus das immunodominante Epitop bei der Immunisierung mit dem gereinigten Lactose:H^+-Carrier darstellt.

Antikörper gegen Aminosäure 125-135 reagieren spezifisch mit dem nach SDS-Gelelektrophorese auf Nitrocellulose übertragenen Carrier, jedoch sehr viel schlechter mit dem membrangebundenen nativen Protein. Zerstörung dieses Epitops durch Proteasespaltung in invertierten Vesikeln zeigt, daß auch dieser Abschnitt der Sequenz des Carriers auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisiert ist.

Die mangelnde Reaktion weiterer peptidspezifischer Antikörper mit dem Lactose:H^+-Carrier deutet darauf hin, daß viele der hydrophilen Segmente des Carriers im Innern des Proteins verborgen oder in einer Konformation fixiert sind, in der sie von peptidspezifischen Antikörpern nicht erkannt werden.

Die vorliegende Arbeit wurde zwischen September 1982 und August 1984 am Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen angefertigt. Teile der Ergebnisse wurden in J.Biol. Chem. 258, 10817-10820 (1983), Eur.J.Biochem. 142, 269-279 (1984) und Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 365, 1063-1064 (1984) veröffentlicht.

Mein Dank gilt Herrn Prof.Dr.P.Overath für Themenstellung, Arbeitsplatz und viele hilfreiche Diskussionen und Anregungen.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Overath möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit danken, besonders Susanne Meeßen, Susanne Grünwald und Edith Straub, die viele der verwendeten Membranen präparierten, sowie Barbara Breidenbend für viele Fotoarbeiten.

Herrn Kurz im Maushaus danke ich für die Betreuung der Tiere, Herrn Reinmuth und seinen Mitarbeitern in der Werkstatt für die Herstellung von Geräten und Frau Munari im Institut für Organische Chemie der Universität für die Durchführung der Aminosäureanalysen.

Besonderen Dank schulde ich Dr.J.K.Wright für die gute Zusammenarbeit, seine stete Hilfsbereitschaft, viele gute Ratschläge und wichtige Anregungen.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. EINLEITUNG..... 1

2. MATERIALIEN UND METHODEN..... 13

2.1. Materialien..... 13
2.1.1. Chemikalien..... 13
2.1.2. Lösungen..... 15
2.1.3. *E.coli*-Stämme..... 15
2.2. Methoden..... 16
2.2.1. Peptidsynthesen..... 16
2.2.1.1. Vorbehandlung von Lösungsmitteln und Merrifield-Harz..... 16
2.2.1.2. Präparation von *t*-BOC-[^{3}H]Aminosäuren..... 16
2.2.1.3. Veresterung der ersten Aminosäure mit dem Harz..... 17
2.2.1.4. Synthesecyclus..... 18
2.2.1.5. Abspaltung der Peptide vom Harz..... 18
2.2.1.6. Hydrogenolytische Entfernung der NO_2-Schutzgruppe.. 20
2.2.1.7. Aufarbeitung der Peptide..... 20
2.2.2. Immunogenpräparation und Immunisierung..... 20
2.2.2.1. Peptid-Protein-Kopplung mit Glutaraldehyd..... 20
2.2.2.2. Peptid-Protein-Kopplung mit diazotiertem Benzidin.. 21
2.2.2.3. Peptid-Protein-Kopplung mit Carbodiimid..... 21
2.2.2.4. Immunisierung..... 22
2.2.3. Antikörperpräparation..... 22
2.2.3.1. Gewinnung von Seren und IgG..... 22
2.2.3.2. Papainspaltung von IgG und F_{ab}-Reinigung..... 24
2.2.3.3. Immobilisierte Peptide für die Affinitätschromatographie..... 24
2.2.3.4. Affinitätschromatographische Reinigung peptidspezifischer Antikörper..... 25
2.2.4. Markierung von Antikörpern..... 25
2.2.4.1. Jodierung von peptidspezifischen Antikörpern..... 25
2.2.4.2. Enzymmarkierung von Anti-$P_{408-417}$-IgG..... 26

Seite

2.2.5. Immunchemische Testsysteme..... 27
2.2.5.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)..... 27
2.2.5.2. Elektrophorese und Immunoblot..... 28
2.2.5.3. Immunpräzipitation..... 29
2.2.5.4. Immunfluoreszenz..... 31
2.2.5.5. Bindung von markierten Antikörpern an Vesikel..... 31
2.2.6. Präparation von Membranen und Proteoliposomen..... 32
2.2.6.1. ^{14}C- und ^{35}S-markierte Rohmembranen..... 32
2.2.6.2. Sonstige Membranvesikel und Proteoliposomen..... 33
2.2.7. Protease-Behandlung von Membranen und Proteoliposomen 33
2.2.7.1. Behandlung mit Carboxypeptidase A..... 33
2.2.7.2. Spaltung mit Thermolysin..... 34
2.2.8. Galactosidbindung und -transport in Gegenwart von Antikörpern..... 34
2.2.8.1. Substratbindung..... 34
2.2.8.2. GalSGal-Melibiose-Gegentransport..... 35
2.2.9. Proteinbestimmung..... 35

3. ERGEBNISSE..... 36

3.1. Synthetische Peptide..... 36
3.1.1. Auswahl der synthetischen Peptide aus der Sequenz des Lactose:H^+-Carriers..... 36
3.1.2. Peptidsynthese..... 37
3.2. Peptidspezifische Antiseren..... 40
3.2.1. Abhängigkeit der Immunantwort von Kopplungs- und Immunisierungsmethoden..... 40
3.2.2. Spezifität der Antiseren..... 42
3.3. Reaktivität der Anti-Peptid-Antikörper mit dem Lactose:H^+-Carrier..... 43
3.3.1. Antikörper gegen den C-Terminus ($P_{408-417}$)..... 43
3.3.1.1. Spezifität für den Carrier in Immunoblot und Immunpräzipitation..... 43
3.3.1.2. Anti-C-Terminus-Antikörper im Antiserum gegen den gereinigten Lactose:H^+-Carrier..... 45

Seite

3.3.1.3. Lokalisierung des C-Terminus' des Lactose:H^+-Carriers in der cytoplasmatischen Membran..... 49
3.3.1.4. Einfluß der Anti-C-Terminus-Antikörper auf Substratbindung und Transport..... 53
3.3.2. Antikörper gegen $P_{125-135}$..... 55
3.3.2.1. Reaktivität mit dem Lactose:H^+-Carrier in Immunoblot und Immunpräzipitation..... 55
3.3.2.2. Reaktivität mit dem membrangebundenen Carrier..... 58
3.3.2.3. Lokalisierung des Peptids (125-135) des Lactose:H^+-Carriers in der Cytoplasmamembran..... 59
3.3.3. Antikörper gegen P_{1-9} , $P_{130-140}$ und $P_{132-144}$..... 62
3.4. Antikörper gegen den synthetischen C-Terminus als Reagentien zur Charakterisierung und Quantifizierung des Lactose:H^+-Carriers..... 63
3.4.1. Orientierung des Carriers in Membranen und rekonstituierten Proteoliposomen..... 63
3.4.2. Quantifizierung des Lactose:H^+-Carriers..... 67
3.4.2.1. Quantitative Immunpräzipitation..... 67
3.4.2.2. Bindung von markiertem Anti-C-Terminus-IgG an invertierte *E.coli*-Membranvesikel..... 69
3.4.2.3. Bestimmung des Carrierspiegels im Immunoblot und Charakterisierung einer *lacY*-Mutante..... 69

4. DISKUSSION..... 73

5. LITERATURVERZEICHNIS..... 87

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet :

t-BOC	*tert.* Butyloxycarbonyl-
BSA	Albumin aus Rinderserum
CPA	Carboxypeptidase A
DCC	*N*,*N*'-Dicyclohexylcarbodiimid
DIEA	*N*,*N*-Diisopropylethylamin
DMF	*N*,*N*-Dimethylformamid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-*bis*-(β-aminoethylether)-*N*,*N*'-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
F_{ab}	Antigen bindendes Fragment von IgG
GalSGal	β-D-Galactopyranosyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
HoBt	1-Hydroxybenzotriazol
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
KLH	Hämocyanin aus keyhole limpet
LiDS	Dodecylsulfat, Li-Salz
MalNEt	*N*-Ethylmaleimid
NpαGal	*p*-Nitrophenyl-α-D-galactopyranosid
P_{n-m}	chemisch synthetisierte Peptide aus der Sequenz des Lactose:H^+-Carriers, vergl. Tabelle 4
PBS	phosphat-gepufferte Saline
SDS	Dodecylsulfat, Na-Salz
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

1. EINLEITUNG

Während die Grundstruktur biologischer Membranen durch die Lipiddoppelschicht als Permeabilitätsschranke bestimmt wird, werden ihre spezifischen Funktionen von Proteinen erfüllt. Eine wesentliche Aufgabe von Membranproteinen ist der selektive Transport hydrophiler Moleküle durch die Membran. Einige Transportsysteme erlauben dabei der Zelle die Akkumulation oder den Ausschluß von Stoffen gegen deren Konzentrationsgefälle: sie katalysieren aktiven Transport. Als Energiequelle nutzen diese Systeme die mit dem Transportvorgang gekoppelte Hydrolyse von Verbindungen wie ATP (primärer aktiver Transport) oder den Konzentrationsgradienten eines zweiten gelösten Stoffes, meist eines Ions, der in gleicher (Symport) oder entgegengesetzter Richtung (Antiport) die Membran passiert; solche Cotransportsysteme katalysieren sekundären aktiven Transport.

Für viele Transportsysteme von Bakterien und höheren Organismen sind Energiequelle und z.T. die beteiligten Membranproteine bekannt (1), aber in keinem Fall kennt man Details der Transportproteinstruktur oder des molekularen Mechanismus' des Transportvorgangs. Das wohl am besten untersuchte Cotransportsystem ist der Lactose:H^+-Carrier von *Escherichia coli*, auch als Lactose-Permease oder M-Protein bezeichnet (2-6). Das System wurde erstmals von Rickenberg et al. (7) beschrieben, die fanden, daß auf Lactose gewachsene *E.coli*-Zellen das nicht metabolisierbare Methyl-1-β-D-galactopyranosid (MeSGal) aus dem Medium akkumulieren können. Der Carrier ist bezüglich des transportierten Galactosids relativ unspezifisch: Neben Lactose und MeSGal werden z.B. auch β-D-Galactosyl-1-thio-β-D-galactopyranosid (GalSGal) und Melibiose (6-*O*-α-D-Galactopyranosyl-D-glucose) ebenso als Substate akzeptiert wie das Trisaccharid Raffinose, das durch β-Galacto-

sidase spaltbare chromogene Substrat *o*-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid, fluoreszierende Dansylgalactoside und das hachaffine Substrat *p*-Nitrophenyl-α-D-galactopyranosid, das zur Quantifizierung des Carriers verwendet wird (8-11).

Die der Theorie von Mitchell (12,13) entsprechende Kopplung des Galactosidtransports mit einer Protonentranslokation wurde von West (14) erstmals 1970 direkt nachgewiesen. Der Carrier nutzt so das elektrochemische Potential ("proton motive force"),

$$\Delta\tilde{\mu}H^+ = \Delta\Psi - 2{,}3\,\frac{R\,T}{F}\,\Delta pH$$

bestehend aus dem elektrischen Potential ($\Delta\Psi$) und der Protonenkonzentrationsdifferenz (ΔpH) über der Membran, als treibende Kraft für die Galactosidakkumulation.

Dieser Galactosid:H^+-Symport ist in Abb.1 schematisch

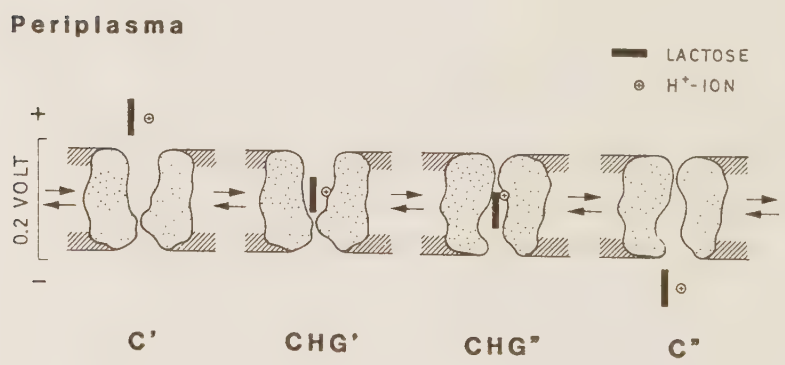
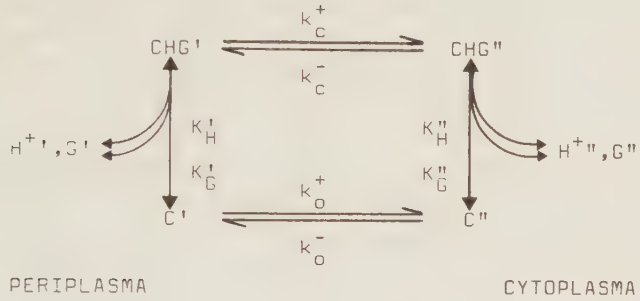


Abb.1 : Schematische Darstellung des Galactosid:H^+-Symports durch den Lactose:H^+-Carrier

dargestellt und kann durch das folgende Schema beschrieben werden:



Der Carrier (C) kann danach zwei Konformationen annehmen, in denen seine Bindungsstellen für Galactosid (G) und Proton (H^+) entweder auf der periplasmatischen (C') oder der cytoplasmatischen (C") Seite der Membran exponiert sind. Ein Galactosidtransport vom Periplasma ins Cytoplasma ergibt sich aus einem einmaligen Durchlaufen des gesamten Cyclus' im Uhrzeigersinn: der Bindung von Galactosid und Proton auf der periplasmatischen Seite (Dissoziationskonstanten: K'_G,K'_H), der Reorientierung des beladenen Carriers (CHG') zur cytoplasmatischen Seite (CHG"; Geschwindigkeitskonstante der Konformationsänderung:k_c^+), der Dissoziation von Galactosid und Proton (K''_G, K''_H) und schließlich der Reorientierung des unbeladenen Carriers (k_o^-). Alle Schritte des Cyclus' sind reversibel, so daß eine Umkehrung des gesamten Cyclus' (k_o^+, k_c^-) in einem Galactosid- und Protonentransport vom Cytoplasma ins Periplasma resultiert.

Fox und Kennedy (15) identifizierten 1965 das M-Protein (Membrankomponente des Lactose-Transportsystems) durch differentielle Markierung mit radioaktivem N-Ethylmaleimid (MalNEt). Sie nutzten die Tatsache, daß eine Thiolfunktion des Carriers durch ein hochaffines Substrat vor der Modifikation durch das SH-Reagens geschützt werden kann, dazu, das Carrierprotein spezifisch zu markieren: Nach Vorbehandlung von carrierhaltigen Membranen mit nicht

radioaktivem MalNEt in Gegenwart von GalSGal, anschließender Markierung mit radioaktivem MalNEt in Abwesenheit des Substrats und Auflösen der Membranen in Natriumdodecylsulfat eluierte die eingebaute Radioaktivität bei der Gelchromatographie in Gegenwart des Detergens' mit einem apparenten Molekulargewicht von M_r= 31 000. Dieses Experiment stellte gleichzeitig eine erste Anreicherung des, allerdings inaktiven Lactose:H^+-Carriers dar. Eine Reinigung des Proteins wurde erst möglich, als *E.coli*-Plasmidstämme verfügbar wurden, die den Lactose:H^+-Carrier überproduzieren.

Die Clonierung des für den Lactose:H^+-Carrier codierenden *lacY*-Gens in Vielkopien-Plasmiden und damit die Überproduktion des Carriers gelang Teather et al. 1978 (16,17). Das *lacY*-Gen ist Teil des Lactose-Operons von *E.coli* (Abb.2a). Neben dem *lacY*-Gen enthält diese Regulationseinheit die Strukturgene für β-Galactosidase (*lacZ*) und Thiogalactosidtransacetylase (*lacA*) sowie regulatorische Sequenzen (Promotor,*P* und Operator,*O*). Die Transkription der Strukturgene — und damit die Synthese der auf dem Lactose-Operon codierten Proteine — unterliegt der negativen Kontrolle durch den *lac*-Repressor, dessen Bindung an die Operator-Region durch induzierende Galactoside (z.B. Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid, IPTG) reguliert wird (18,19). Neben dieser negativen Kontrolle durch den Repressor erfährt das Operon eine positive Kontrolle durch cyclo-AMP und das Katabolit-Gen-Aktivator-Protein, die Katabolit-Repression (20).

Die von Teather et al. (16,17) isolierten Plasmide, pTE18 und pGM21, enthalten ein verkürztes Lactose-Operon — bestehend aus den Regulationselementen (*P*, *O*), dem vollständigen *lacY*-Gen, aber nur kleinen Teilen von *lacZ* und *lacA* — in einem Vielkopienvektor (pBR322 bzw. pACYC184; Abb.2b). In *E.coli*-Stämmen (z.B. T206), die den *lac* -Repressor überproduzieren (19) und diese Plasmide tragen, ist die Synthese des Lactose:H^+-Carriers durch IPTG induzierbar. Nach

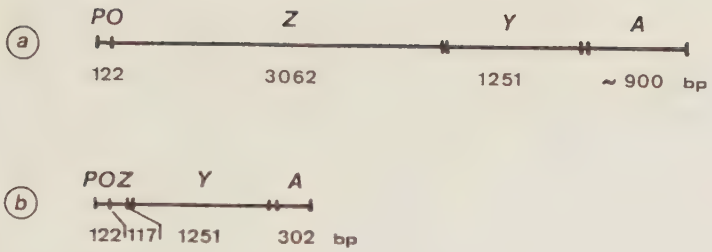


Abb.2 : Das Lactose - Operon

a) *lac*-Operon von *E.coli* K12

b) Verkürztes *lac*-Operon in den Plasmiden pTE18 und pGM21 (bp=Basenpaare, Erläuterungen im Text)

Wachstum solcher Zellen für 2 - 3 Generationen in Gegenwart von IPTG erreicht der Carrierspiegel etwa 15 % des gesamten Proteins der Cytoplasmamembran und liegt damit etwa zehnfach höher als in Membranen aus vergleichbaren Wildtypstämmen.

Ausgehend von solchen, den Carrier überproduzierenden Stämmen, wurden in den letzten Jahren zwei Verfahren zur Reinigung des Lactose:H^+-Carriers und Rekonstitution in Proteoliposomen beschrieben (10,11,21-24). Sie beruhen auf einer Auflösung der Membran durch das nicht-ionische Detergens Dodecylmaltosid (10,11,24) oder durch eine Kombination von Octylglucosid und zusätzlichen Phospholipiden (21-23), gefolgt von einer Ionenaustauschchromatographie in Gegenwart des Detergens. Schließlich wird das Detergens durch Adsorption an eine Polystyrolmatrix oder — im Fall von Octylglucosid — durch Verdünnen der Probe und unterschreiten der kritischen Micellkonzentration entfernt. Damit werden wieder Phospholipidvesikel gebildet, die den Carrier enthalten (Proteoliposomen).

Substratbindungs- und Transportstudien am gereinigten, rekostituierten Carrier sowie an carrierhaltigen Membran-

vesikeln und Zellen führten zu einem kinetischen Modell, das erklärt, wie der Carrier das elektrochemische Potential ($\Delta\tilde{\mu}H^+$) zur Akkumulation von Galactosiden nutzt (5,25): Der Carrier enthält eine Galactosidbindungsstelle pro Polypeptidkette (9,17,26) und ist im physiologischen pH-Bereich weitgehend protoniert (25,27-29). Die Substratbindungskonstanten auf beiden Seiten der Membran (K'_G und K''_G; vergl. Schema auf S.3) und die Translokationskonstanten des beladenen Carriers in beide Richtungen (k_c^+ und k_c^-) sind jeweils annähernd gleich und weitgehend unabhängig von $\Delta\tilde{\mu}H^+$(25,26). In Abwesenheit eines elektrischen Potentials ($\Delta\Psi$) sind auch die Translokationsraten des unbeladenen Carriers (k_o^+ und k_o^-) etwa gleich groß und der Carrier somit funktionell völlig symmetrisch.

Das elektrische Potential über die *E.coli*-Cytoplasmamembran ($\Delta\Psi$, Innenseite negativ) wirkt nun auf die Translokationsraten des — formal negativ geladenen — unbeladenen Carriers: der Rückkehrschritt wird beschleunigt, k_o^- wird also größer, und umgekehrt wird k_o^+ kleiner. Dadurch wird das Gleichgewicht zwischen den beiden Konformationen des Carriers verschoben: die cytoplasmatische Seite der Membran verarmt an zugänglichen Bindungsstellen, die auf der periplasmatischen Seite zusätzlich erscheinen.

Die Protonenkonzentrationsdifferenz (ΔpH) bewirkt ebenfalls eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen den beiden Carrierkonformationen, die sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt. Der Effekt beider Komponenten von $\Delta\tilde{\mu}H^+$ ist also eine Erhöhung der Zahl der auf der periplasmatischen Seite zugänglichen Galactosidbindungsstellen und im Fließgleichgewicht (steady-state-Bedingung: $CHG' \cdot k_c^+ = CHG'' \cdot k_c^-$ und mit $k_c^+ \approx k_c^-$: $CHG' = CHG''$) ergibt sich daraus eine $\Delta\tilde{\mu}H^+$ entsprechende Galactosidakkumulation.

Der gereinigte und in Proteoliposomen rekonstituierte Lactose:H^+-Carrier zeigt für alle Transportvorgänge (Influx, Efflux, Galactosidaustausch und durch $\Delta\Psi$ oder ΔpH getriebenen Transport) nahezu gleiche Substrataffinitäten und

Wechselzahlen, wie sie in carrierhaltigen Membranvesikeln gemessen wurden (24,30), allerdings sind die in Zellen gemessenen Transportraten erheblich höher (24). Eine — möglicherweise regulatorische — Rolle eines weiteren, löslichen Proteins oder eines Cofaktors (z.B. eines Metallions) für den Galactosidtransport in *E.coli* kann daher nicht endgültig ausgeschlossen werden.

1980 bestimmten Büchel et al. (31) die Nucleotidsequenz des *lacY*-Gens. Dieses codiert für ein Protein mit 417 Aminosäuren (Abb.3) und einem Molekulargewicht von M_r = 46 504, das damit um etwa 50 % über dem durch Gelchromatographie (15) oder Gelelektrophorese (16,22,32,33) bestimmten apparenten Molekulargewicht des Carriers liegt. Eine naheliegende posttranslationale Prozessierung des Carrier-Proteins konnte von Ehring et al. (33) ausgeschlossen werden. Sie synthetisierten den Carrier in einem zellfreien Transkriptions-Translations-System mit dem Plasmid pGM21 als Matrize und fanden für dieses *in vitro* synthetisierte Protein das gleiche apparente Molekulargewicht wie für den aus Membranen von Carrier-Überproduzenten in inaktiver Form gereinigten Lactose:H^+-Carrier (11). Auch stimmte die N-terminale Aminosäuresequenz von *in vivo*- und *in vitro*-Produkt mit der Nucleotidsequenz des *lacY*-Gens überein. Ebenso entspricht die Aminosäurezusammensetzung des gereinigten Carriers der aus der Nucleotidsequenz vorhergesagten (33,34), und bei der Gelchromatographie des Carriers in Hexamethylphosphorsäuretriamid wird das korrekte Molekulargewicht von M_r = 46 500 erhalten (35).

In jüngster Zeit durchgeführte physikalisch-chemische Untersuchungen des durch Dodecylsulfat aus Proteoliposomen gelösten, gereinigten Carriers (36,37) geben eine Erklärung für das offenbar falsche, durch Gelelektrophorese oder Gelchromatographie in Gegenwart von Dodecylsulfat bestimmte apparente Molekulargewicht des Carriers. Wie Ramanspektroskopie und zeitaufgelöste Fluoreszenzanisotropiemessungen

Met-Tyr-Tyr-Leu-Lys*-Asn-Thr-Asn-Phe-Trp-Met-Phe-Gly-Leu-Phe-Phe-Phe-Phe-Tyr-Phe- (20)
Phe-Ile-Met-Gly-Ala-Tyr-Phe-Pro-Phe-Phe-Pro-Ile-Trp-Leu-His-Asp*-Ile-Asn-His-Ile- (40)
Ser-Lys*-Ser-Asp*-Thr-Gly-Ile-Ile-Phe-Ala-Ala-Ile-Ser-Leu-Phe-Ser-Leu-Leu-Phe-Gln- (60)
Pro-Leu-Phe-Gly-Leu-Leu-Ser-Asp*-Lys*-Leu-Gly-Leu-Arg*-Lys*-Tyr-Leu-Leu-Trp-Ile-Ile- (80)
Thr-Gly-Met-Leu-Val-Met-Phe-Ala-Pro-Phe-Phe-Ile-Phe-Ile-Phe-Gly-Pro-Leu-Leu-Gln- (100)
Tyr-Asn-Ile-Leu-Val-Gly-Ser-Ile-Val-Gly-Gly-Ile-Tyr-Leu-Gly-Phe-Cys-Phe-Asn-Ala- (120)
Gly-Ala-Pro-Ala-Val-Glu*-Ala-Phe-Ile-Glu*-Lys*-Val-Ser-Arg*-Arg*-Ser-Asn-Phe-Glu*-Phe- (140)
Gly-Arg*-Ala-Arg*-Met-Phe-Gly-Cys-Val-Gly-Trp-Ala-Leu-Cys-Ala-Ser-Ile-Val-Gly-Ile- (160)
Met-Phe-Thr-Ile-Asn-Asn-Gln-Phe-Val-Phe-Trp-Leu-Gly-Ser-Gly-Cys-Ala-Leu-Ile-Leu- (180)
Ala-Val-Leu-Leu-Phe-Phe-Ala-Lys*-Thr-Asp*-Ala-Pro-Ser-Ser-Ala-Thr-Val-Ala-Asn-Ala- (200)
Val-Gly-Ala-Asn-His-Ser-Ala-Pro-Ser-Leu-Lys*-Leu-Ala-Leu-Glu*-Leu-Phe-Arg*-Gln-Pro- (220)
Lys*-Leu-Trp-Phe-Leu-Ser-Leu-Tyr-Val-Ile-Gly-Val-Ser-Cys-Thr-Tyr-Asp*-Val-Phe-Asp*- (240)
Gln-Gln-Phe-Ala-Asn-Phe-Phe-Thr-Ser-Phe-Phe-Ala-Thr-Gly-Glu*-Gln-Gly-Thr-Arg*-Val- (260)
Phe-Gly-Tyr-Val-Thr-Thr-Met-Gly-Glu*-Leu-Leu-Asn-Ala-Ser-Ile-Met-Phe-Phe-Ala-Pro- (280)
Leu-Ile-Ile-Asn-Arg*-Ile-Gly-Gly-Lys-Asn-Ala-Leu-Leu-Leu-Ala-Gly-Thr-Ile-Met-Ser- (300)
Val-Arg*-Ile-Ile-Gly-Ser-Ser-Phe-Ala-Thr-Ser-Ala-Leu-Glu*-Val-Val-Ile-Leu-Lys*-Thr- (320)
Leu-His-Met-Phe-Glu*-Val-Pro-Phe-Leu-Leu-Val-Gly-Cys-Phe-Lys*-Tyr-Ile-Thr-Ser-Gln- (340)
Phe-Glu*-Val-Arg*-Phe-Ser-Ala-Thr-Ile-Tyr-Leu-Val-Cys-Phe-Cys-Phe-Phe-Lys*-Gln-Leu- (360)
Ala-Met-Ile-Phe-Met-Ser-Val-Leu-Ala-Gly-Asn-Met-Tyr-Glu*-Ser-Ile-Gly-Phe-Gln-Gly- (380)
Ala-Tyr-Leu-Val-Leu-Gly-Leu-Val-Ala-Leu-Gly-Phe-Thr-Leu-Ile-Ser-Val-Phe-Thr-Leu- (400)
Ser-Gly-Pro-Gly-Pro-Leu-Ser-Leu-Leu-Arg*-Arg*-Gln-Val-Asn-Glu*-Val-Ala

Abb.3 : Aminosäuresequenz des Lactose:H^+-Carriers,

abgeleitet aus der Nucleotidsequenz des *lacY*-Gens (31). Die etwa 20 Aminosäurereste langen, stark hydrophoben Abschnitte im N- und C-terminalen Bereich der Sequenz sind unterstrichen, geladene Aminosäurereste durch * gekennzeichnet.

zeigten, wird das Protein durch das ionische Detergens nicht vollständig entfaltet, sondern behält seine kompakte Struktur weitgehend bei.

Auf der Basis des hohen α-Helix-Gehalts des gereinigten Lactose:H^+-Carriers (37,38) sowie des hohen Anteils von hydrophoben Resten in seiner Aminosäuresequenz (Abb.3 u.4) und in Analogie zur Struktur von Bacteriorhodopsin (39)

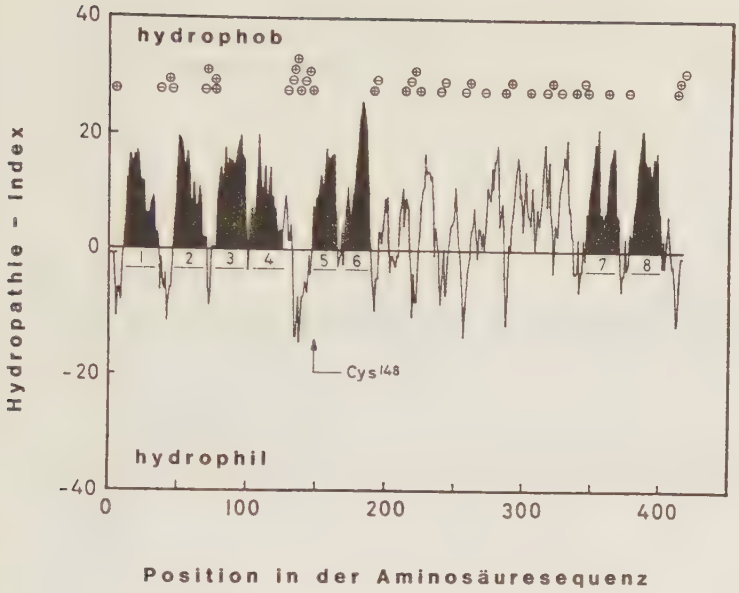


Abb.4 : Hydropathie-Profil des Aminosäuresequenz des Lactose:H^+-Carriers

Jeweils über 7 in der Sequenz benachbarte Aminosäurereste summierte Hydropathieindices, aufgetragen gegen die Position der Aminosäuren in der Sequenz, ergeben das Hydropathieprofil des Carriers nach Kyte & Doolittle (40). Die jeweils etwa 20 Aminosäurereste langen, hydrophoben, vermutlich als α-Helices die Membran überspannenden Abschnitte des Proteins sind schwarz unterlegt. Außerdem sind die Positionen geladener Aminosäurereste und des von Beyreuther et al. (41) identifizierten Cysteins eingezeichnet, das durch hochaffine Substrate vor der Modifikation durch MalNEt geschützt wird.

wurden Modelle für die Sekundärstruktur des Carriers vorgeschlagen (2,5,37,38). Danach sollen bis zu 14 α-Helices, jede etwa 20 Aminosäurereste lang, verbunden durch kurze, schleifenförmige Abschnitte des Proteins, die Membran in Zick-Zack-Form überspannen (Abb.5). Die besonders hydrophoben Abschnitte in der N-terminalen Hälfte und im C-termina-

len Bereich des Proteins (vergl. Abb.3 u.4) könnten dabei in ringförmiger Anordnung den hydrophileren Bereich des Moleküls, der die Galactosidbindungsstelle bilden könnte, gegen die Lipidphase abschirmen.

Abb.5 : Vereinfachte Darstellung eines Modells für die Struktur des Lactose:H^+-Carriers (nach 37)

Neben den in Abb.3 u.4 eingezeichneten hydrophoben Abschnitten wurde auch der hydrophilere Teil der Aminosäuresequenz des Carriers zwischen Position 180 und 350 in, durch kurze Peptidschleifen verbundene, membranüberquerende α-Helices gefaltet, wobei diese Helices amphiphilen Charakter, also jeweils eine hydrophilere und eine hydrophobere Seite besitzen sollen (F.Jähnig, pers. Mitteilung). Die postulierten α-helicalen Bereiche sind durch rechteckige Kästen dargestellt, die Positionen der Aminosäuren, mit denen die Helices beginnen und enden, sowie die Verteilung der geladenen Aminosäurereste sind eingezeichnet.

Die Methode der Wahl zur Bestätigung oder Widerlegung eines solchen Modells wäre sicherlich die Kristallisierung des Proteins und die Aufklärung seiner dreidimensionalen Struktur durch Röntgen- oder Elektronenbeugung. Trotz einiger Fortschritte bei der Kristallisierung von Membranproteinen (42,43) ist jedoch für kein integrales Membranprotein bislang eine ähnlich gute Auflösung erreicht wor-

den wie für das Bacteriorhodopsin, dessen Struktur Henderson und Unwin (39) bereits 1975 durch Elektronenbeugung an Purpurmembran aus *Halobacterium halobium*, in der dieses Protein als zweidimensionaler Kristall vorliegt, mit einer Auflösung von etwa 0,7 nm bestimmten. Membranimpermeable, hochmolekulare Reagentien, z.B. Proteasen oder Antikörper, sind daher wichtige Hilfsmittel, um die Orientierung eines membranüberspannenden Proteins zu untersuchen. Monoklonale Antikörper (44) gegen den Lactose:H^+-Carrier wurden 1982 in zwei amerikanischen Arbeitsgruppen präpariert (45,46), aber bisher konnte keines der von diesen Antikörpern erkannten Epitope einem bestimmten Abschnitt in der Aminosäuresequenz des Carriers zugeordnet werden. Ein alternativer Weg, Antikörper gegen einzelne Epitope eines Proteins zu gewinnen, ist die Immunisierung mit synthetischen Peptiden, deren Sequenz kurzen Abschnitten aus der Aminosäuresequenz des zu untersuchenden Proteins entspricht (47,48).

Die bei der Immunisierung eines Wirbeltiers mit einem intakten Protein induzierten Antikörper sind generell gegen wenige antigene Stellen (Epitope) auf der Oberfläche gerichtet und solche immunogene Determinanten haben meist diskontinuierlichen Charakter, setzen sich also aus Aminosäureseitenketten zusammen, die in der Sequenz des Proteins nicht unmittelbar benachbart sind (49-51, Zitate in 48 und 52). Auch aus in der Sequenz benachbarten Aminosäureresten zusammengesetzte immunogene Determinanten eines intakten Proteins sind meist konformationsabhängig, d.h. die gegen sie gerichteten Antikörper reagieren nicht - oder nur sehr schlecht - mit dem denaturierten Protein (53,54). Bis vor wenigen Jahren war man daher allgemein der Auffassung, daß nur in Ausnahmefällen synthetische Peptide aus der Aminosäuresequenz eines Proteins Antikörper induzieren könnten, die mit dem intakten Protein reagieren. In den letzten Jahren, vor allem in der Gruppe von

Lerner erzielte Ergebnisse zeigten jedoch (52,55), daß durch synthetische Peptide auch Antikörper gegen Teile eines Proteins induziert werden können, gegen die bei der Immunisierung mit dem intakten Protein keine Antikörper gebildet werden. Lerner vermutete 1982 (52), daß "wahrscheinlich einzige Voraussetzung für die Auswahl eines immunogenen Peptids" sei, daß "ein Teil der Sequenz an der Oberfläche des Moleküls liege, um für den Antikörper erreichbar zu sein".

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war die Anwendung dieses Ansatzes auf ein integrales Membranprotein, den Lactose:H^+-Carrier von *E.coli*. Dazu sollten aus der Aminosäuresequenz des Carriers geeignete hydrophile Abschnitte ausgewählt, chemisch synthetisiert und, zur Erhöhung ihrer Immunogenität an ein Trägerprotein gekoppelt, zur Immunisierung von Kaninchen verwendet werden. So gewonnene Antikörper wurden auf ihre Reaktivität mit dem Lactose:H^+-Carrier überprüft. Bei positivem Ergebnis sollte die Orientierung der entsprechenden Abschnitte in der Aminosäuresequenz des Carriers in der Membran bestimmt werden, um Erkenntnisse über die dreidimensionale Struktur des Proteins zu gewinnen, die Voraussetzung für ein Verständnis der molekularen Grundlage des aktiven Transports von Galactosiden durch den Lactose:H^+-Carrier sind.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Materialien

2.1.1. Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien sind alphabetisch aufgelistet, die Zahlen in Klammern beziehen sich auf die unten angegebenen Bezugsquellen. Nicht aufgeführte Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen und waren analysenrein, soweit erhältlich.

Acrylamid (21)
[^{14}C] Aminosäuremischung (1)
Antikörper gegen Kaninchen-IgG, Ziege, markiert mit
  Alkalischer Phosphatase (23)
  Fluorescein (4)
  Peroxidase (13)
t-BOC-Aminosäuren (2)
t-BOC-Oxyiminophenylacetonitril(11)
Borax (22)
Borsäure (22)
5-Brom-4-chlorindoxylphosphat (22)
Bromphenolblau (21)
BSA, ELISA grade (22)
Carboxypeptidase A, PMSF-behandelt (21)
CM-Cellulose (21)
DEAE-Cellulose (21)
Chloramin T (22)
4-Chlor-1-naphthol (22)
Diazoniumphenyl-SP500 (21)
DIEA (10)
2,5-Diphenyloxazol (15)
Dodecyl-β-D-maltosid (6)
Ethylenglykol-*bis*-(β-aminoethylether)-*N*,*N*'- Tetraessigsäure (EGTA) (22)
Ethanol, vergällt mit Petrolether (19)
Freund's Adjuvans (8)
GalSGal (22)
[6-^{3}H] GalSGal (7)
Glutaraldehyd (22)
HoBt (11)
p-Hydroxymercuribenzolsulfonat (22)
IPTG (2)
L-[4,5-^{3}H] Leucin (14)
LiDS (21)
Lubrol PX (22)
Melibiose (20)
Merrifield-Polymer, Polystyrol-Divinylbenzol(1%)-Copolymer, 200-400 mesh, ca. 1 mMol Cl/g Harz (11,17)
L-[^{35}S] Methionin (1)
N,*N*'-Methylenbisacrylamid (21)
N-Morpholinoethansulfonsäure (22)

Myristinsäure (22)
$Na^{125}J$ (1)
Nitro-Blautetrazolium (22)
Nitrocellulose, 0,45µm Porengröße (18)
p-Nitrophenylphosphat, SIGMA 104 (22)
NpαGal (21)
[6'-^{3}H]NpαGal (24)
Papain (22)
Peroxidase aus Meerrettich, Reinheitsgrad I, lyophilisiert (5)
o-Phenylendiamin (22)
Polylysin, $M_r \approx 50000$ (22)
Protaminsulfat (21)
Rhodaminisothiocyanat (22)
SDS (21)
Sephadex G 15, G 25 (16)
aktivierte CH-Sepharose 4 B (16)
Staphylococcus aureus-Zellen, formalinfixiert (3,6)
Tetracyclin: Reverin (12)
Thermolysin (6)
Triton X-100, speziell gereinigt für die Szintillationstechnik (21)
Tween 20 (22)
L-[3,4-^{3}H]Valin

Bezugsquellen :

(1) Amersham, Braunschweig
(2) Bachem, Bubendorf (Schweiz)
(3) BRL, Karlsruhe
(4) Bio-Merieux, Nürtingen
(5) Boehringer, Mannheim
(6) Calbiochem, Gießen
(7) CEA, Gif-sur-Yvette (Frankreich), bezogen über Zinsser, Frankfurt
(8) Difco, Detroit (USA), bezogen über Hedinger, Stuttgart
(9) Dynatech, Denkendorf/Württ.
(10) EGA-Chemie, Steinheim/Albuch
(11) Fluka, Neu-Ulm
(12) Höchst, Frankfurt
(13) Miles, München
(14) New England Nuclear, Dreieich
(15) Packard, Frankfurt
(16) Pharmacia, Freiburg
(17) Pierce Eurochemie, Rotterdam (Niederlande)
(18) Sartorius, Göttingen
(19) Schweickhardt, Tübingen
(20) Senn Chemicals, Dielsdorf (Schweiz)
(21) Serva, Heideberg
(22) Sigma, München
(23) Tago, Burlingam (CA,USA), bezogen über Medac, Hamburg
(24) Präparation von NpαGal beschrieben in (56)

2.1.2. Lösungen

PBS, phosphat-gepufferte Saline:
140 mM NaCl
3 mM KCl
8 mM Na_2HPO_4
1,5 mM KH_2PO_4

Borat-Saline:
100 mM Borsäure
25 mM Borax (Dinatrium-tetraborat)
75 mM NaCl

2.1.3. *E.coli*-Stämme

Tabelle 1

Bezeichnung	*lac*-Genotyp Chromosom /F' /Plasmid	*lac*-Phänotyp	Referenz
ML30	$I^+O^+Z^+Y^+$ /- /-	$I^+O^+Z^+Y^+$	(7)
ML308-225	$I^-O^+Z^-Y^+$ /- /-	$I^-O^+Z^-Y^+$	(57)
K131	$I^-O^+Z^-Y^-$ /- /-	$I^-O^+Z^-Y^-$	(58)
T184	$I^+O^+Z^-Y^-$ /$I^qO^+Z^-(Y^+)$ /-	$I^qO^+Z^-Y^-$	(17)
T206	$I^+O^+Z^-Y^-$ /$I^qO^+Z^-(Y^+)$ /$\Delta IO^+\Delta ZY^+$	$I^qO^+Z^-Y^+$	(17)
T4JL'	$I^+O^+Z^+Y^-$ /- /$\Delta IO^+\Delta ZY^+$	$I^{\pm}O^+Z^+Y^+$	(59)
X71	$I^-O^+Z^+Y^+$ /- /-	$I^-O^+Z^+Y^+$	(137)
X71-54	$I^-O^+Z^+Y^{un}$ /- /-	$I^-O^+Z^+Y^{un}$	(137)

Erläuterungen:
I^q: Überproduktion von Repressor, $I^{\pm}$: lac-Operon partiell dereprimiert,
$Z^-(Y^+)$: keine Expression von lacY durch polare Mutation in lacZ,
Y^{un}: scheinbare Entkopplung von H^+- und Galactosid-Transport durch den Carrier

2.2. Methoden

2.2.1. Peptidsynthesen

Die Peptide wurden nach der Merrifield-Festphasenmethode (60-62) an chlormethyliertem Polystyrol-Divinylbenzol-Copolymer als Trägerharz synthetisiert. Die L-Aminosäuren wurden als *t*-BOC(=*tert*Butyloxycarbonyl)-Derivate (intermediäre Schutzgruppe) und mit folgenden konstanten Schutzgruppen eingesetzt: Arg als Nitro-Derivat, Asp und Glu als β- bzw. γ-Benzylester, Ser und Thr als Benzylether und Lys als *N*(ε)-Benzyloxycarbonyl-Derivat.

2.2.1.1. Vorbehandlung von Lösungsmitteln und Merrifield-Harz (61,62)

CH_2Cl_2 wurde zum Entfernen von HCl-Spuren über wasserfreiem Na_2CO_3 destilliert, Diisopropylethylamin (DIEA) mit Wasser gewaschen, über NaOH getrocknet, destilliert und bei 4°C in einer braunen Flasche aufbewahrt. Dioxan wurde über Molekularsieb 4Å getrocknet, über Aluminiumoxid filtriert und unter N_2 aufbewahrt, Trifluoressigsäure (TFA) redestilliert und bei 4°C gelagert. Das Chlormethylpolystyrol (von FLUKA für BOC-Arg(NO_2)-Harz, von PIERCE für BOC-Ala-Harz) wurde 1 h mit CH_2Cl_2 gerührt, auf einer Glasfritte nacheinander mit 100%, 60%, 30% Dioxan in H_2O, mit H_2O, mit 30%, 60% und 100% Methanol gewaschen und über $CaCl_2$ im Vakuum getrocknet.

2.2.1.2. Präparation von *t*-BOC-[^{3}H]Aminosäuren

Die Synthese von *t*-BOC-[^{3}H]Leucin und *t*-BOC-[^{3}H]Valin erfolgte nach Itoh et al. (63,64): 10 mmol L-Aminosäure und 9,25 MBq [^{3}H]Aminosäure wurden in 9 ml Wasser gelöst und 9 ml Dioxan sowie 2,71 g (11 mmol) 2-(BOC-oxyimino)-2-phenylacetonitril ("BOC-ON") zugegeben. Die Suspension

wurde 4 h oder über Nacht bei Raumtemperatur gerührt, die dann klare, leicht gelbe Lösung mit 15 ml Wasser verdünnt und mit 4 x 20 - 25 ml Diethylether gewaschen. Die wässrige Phase wurde bei 0°C mit kalter 1 N Salzsäure angesäuert (pH 1-2) und die ausgefallene t-BOC-Aminosäure mit Essigsäureethylester (4 x 20 ml) extrahiert. Nach mehrmaligem Waschen der vereinigten organischen Phasen mit HCl-saurer gesättigter NaCl-Lösung und Trocknen über $MgSO_4$ wurden diese am Rotationsverdampfer bis zum Öl eingeengt. t-BOC-[^{3}H]Leucin wurde aus Methanol durch Zugabe von etwas Wasser ausgefällt und im Wasserstrahlvakuum getrocknet, t-BOC-[^{3}H]Valin wurde als Öl zur Synthese eingesetzt. Beide Produkte waren dünnschichtchromatographisch rein, ihre R_f-Werte stimmten mit denen von Vergleichssubstanzen überein. Die Ausbeuten, ermittelt aus der Radioaktivität, betrugen ~90 % für das Leucin- und ~95 % für das Valin-Derivat.

2.2.1.3. Veresterung der ersten Aminosäure mit dem Harz

Die t-BOC-Alanyl- und t-BOC-Nitroarginyl-Harze wurden nach der Cäsiumsalzmethode von Gisin (65) präpariert: Zur Herstellung der Cäsiumsalze wurden 1 - 2 g BOC-Aminosäure in 15 ml 80 % Ethanol gelöst und mit wässriger $CsCO_3$-Lösung am pH-Meter neutralisiert. Der nach Evaporation erhaltene Rückstand wurde mehrfach aus Benzol einrotiert und über P_2O_5 getrocknet.

Das gewaschene und getrocknete Chlormethylpolystyrol (2,5 meq Cl) und 2,5 mmol BOC-Aminosäure-Cs-Salz wurden in 25 ml DMF bei 50°C über Nacht gerührt, das Harz jeweils mehrfach mit DMF, DMF/H_2O 9:1, DMF und Ethanol gewaschen und im Vakuum über $CaCl_2$ getrocknet.

Zur Bestimmung des Substitutionsgrads (66) wurden 15 - 20 mg BOC-Aminosäure-Harz in CH_2Cl_2 gequollen (5 min) und die Schutzgruppe mit 40 % TFA/CH_2Cl_2 abgespalten (2 x 15 min). Nach Waschen mit CH_2Cl_2 (5 x 1 min) wurde mit 5 % (v/v) DIEA in CH_2Cl_2 neutralisiert (2 x 3 min), er-

neut gewaschen (5 x 1 min), schließlich mit 0,1 M Pikrinsäure in CH_2Cl_2 behandelt (5 x 1 min) und das überschüssige Pikrat durch Waschen mit CH_2Cl_2 entfernt (5 x 1 min). Das gebundene Pikrat wurde mit 2 x 5 ml 5 % DIEA in CH_2Cl_2 und 3 x 5 ml CH_2Cl_2 eluiert und durch die Extinktion der 1:5 bis 1:20 mit 95 % Ethanol verdünnten, vereinigten Eluate bei 358 nm quantifiziert (ε_{358} = 1,45 x 10^4). Der so bestimmte Substitutionsgrad betrug 0,4 mmol/g BOC-Ala-Harz und 0,15 mmol/g BOC-Arg(NO_2)-Harz.

2.2.1.4. Synthesecyclus

Die schrittweise Verlängerung der am Polystyrolharz gebundenen Peptide wurde in einem silikonisierten 20 ml - Glasgefäß mit Normschliff am oberen, Glasfritte und Hahn am unteren Ende durchgeführt (vergl. Reaktionsgefäß in (61), Seite 39). Die geschützten Aminosäuren wurden über ihre, mit DCC als Kopplungsreagens *in situ* gebildeten HoBt-Ester gekoppelt. Die einzelnen Schritte des Synthesecyclus' sind in Tabelle 2 aufgeführt. Der Fortgang der Synthese wurde durch den Kaiser-Ninhydrintest (67) jeweils nach Schritt 13 überprüft, bei positiver Reaktion, also unvollständiger Kopplung, wurde ein weiterer Kopplungscyclus durchgeführt (Wiederholung der Schritte 4 - 9). In jedes der Peptide wurde eine [^{3}H]Aminosäure eingebaut (0,925 MBq/mmol, vergl. Abschn. 2.2.1.2 und Tabelle 5).

In Abweichung vom Syntheseschema in Tab.2 wurden Asn und Gln als aktive Ester gekoppelt (statt Schritt 6 - 9): Nach Waschen mit DMF (2 x 1 min) wurde über Nacht mit 2 Äquivalenten BOC-Aminosäure-*p*-nitrophenylester und 1 Äquivalent HoBt in DMF inkubiert und wiederum mit DMF gewaschen (2 x 1 min).

2.2.1.5. Abspaltung der Peptide vom Harz (62)

Das zuletzt in Essigsäure und Methanol gewaschene und im Vakuum getrocknete Peptidharz wurde in einem Dreihals-

Tabelle 2 : Synthesecyclus bei DCC-Kopplung

Schritt		Reagens	Zeit
1	Quellen und Waschen	CH_2Cl_2	2 x 5 min
2	Abspalten der Schutzgruppe	40 % TFA (v/v) in CH_2Cl_2	1 x 5 min + 1 x 25 min
3	Waschen	CH_2Cl_2	5 x 1 min
4	Neutralisieren	5 % (v/v) DIEA in CH_2Cl_2	1 x 1 min + 1 x 5 min
5	Waschen	CH_2Cl_2	3 x 1 min
6	Waschen	CH_2Cl_2/DMF 4:1	2 x 1 min
7	Äquilibrieren	je 2 Äquivalente BOC-Aminosäure und HoBt in CH_2Cl_2/DMF 4:1	1 x 10 min
8	Kopplung	Zugabe von 2 Äquivalenten DCC in CH_2Cl_2/DMF 4:1	3 - 20 h
9	Waschen	CH_2Cl_2/DMF 4:1	2 x 1 min
10 bis 13	Wiederholung der Schritte 6 bis 9		
14	Waschen	Ethanol	2 x 2 min
(weiter bei Schritt 1)			

kolben in ~20 ml TFA (für Peptide mit Tyr: 20 % Anisol in TFA) suspendiert. Unter Rühren wurde 60 min Bromwasserstoff eingeleitet, dann 10 min lang N_2. Die Suspension wurde filtriert, das Harz nacheinander mit TFA und Methanol gewaschen und die vereinigten Filtrate am Rotationsverdampfer bei ≤ 30°C eingeengt. Die rohen Peptide wurden mehrfach aus Methanol/H_2O (1:1) oder Essigsäure/H_2O (3:1) einrotiert und mit Diethylether gewaschen.

2.2.1.6. Hydrogenolytische Entfernung der NO_2-Schutzgruppe

Die Nitro-Schutzgruppe der Guanidinofunktion von Arg wurde durch katalytische Transferhydrogenierung (68) entfernt. Je nach Löslichkeit der Peptide erfolgte die Transferhydrogenierung mit Ameisensäure/Ammoniumformiat in verschiedenen Mischungen von Methanol, Essigsäure, H_2O und DMF mit Palladium/Aktivkohle oder Palladiumschwarz als Katalysator, wobei die Abspaltung der Schutzgruppe über die Abnahme der Absorption der Nitroguanidinofunktion (62) bei 271 nm verfolgt wurde ($\varepsilon = 1{,}5 \times 10^4$).

2.2.1.7. Aufarbeitung der Peptide

Die Entfernung niedermolekularer Verunreinigungen aus den freien Peptiden erfolgte durch Chromatographie an Sephadex G 15 in Wasser, 10 % Essigsäure oder 25 mM Ammoniumformiat. Die radioaktiven Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Die Gesamtausbeuten der Peptidsynthesen lagen zwischen 20 und 50 %, berechnet aus der ^3H-Radioaktivität.

Für die Aminosäureanalysen wurde jeweils ein Aliquot der Peptide (0,2 - 2 µmol) mit 6 N HCl bei 105°C hydrolysiert (22 - 48 h). Die Hydrolysate wurden jeweils mehrmals aus Wasser zur Trockne einrotiert.

2.2.2. Immunogenpräparation und Immunisierung

2.2.2.1. Peptid-Protein-Kopplung mit Glutaraldehyd (69)

Durch Glutaraldehyd wurden P_{1-9}, $P_{125-135}$, $P_{132-144}$ und $P_{408-417}$ an KLH für die Immunisierung sowie $P_{408-417}$ an BSA für den ELISA gekoppelt.

Eine Lösung (0,5 - 2 ml) von Peptid (1 - 4 mM) und Protein (6 - 13 mg/ml) in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7, wurde während 30 min unter Rühren tropfenweise mit 1/2 Vol. 26 mM Glutaraldehyd versetzt und der Ansatz über Nacht bei

Raumtemperatur gerührt. Wegen der geringen Löslichkeit von P_{1-9} bei neutralem pH erfolgte die Kopplung dieses Peptids in stark alkalischer Lösung (pH>12). Die Peptid-KLH-Konjugate wurden zur Entfernung von überschüssigem Reagens und nicht gekoppeltem Peptid über 1 - 2 Tage bei 4°C gegen mindestens 3 x 2 l PBS dialysiert. Die Kopplungsausbeuten wurden aus der Radioaktivität der Ansätze vor und nach der Dialyse berechnet. Die Reinigung des $P_{408-417}$-BSA-Konjugats erfolgte durch Gelfiltration an Sephadex G 25.

2.2.2.2. Peptid-Protein-Kopplung mit diazotiertem Benzidin

Zur Diazotierung (70) wurden 45 ml Benzidinlösung (1,25 mmol in 0,2 N HCl) bei 0°C unter Rühren langsam mit 5 ml 0,5 M $NaNO_2$ versetzt, 30 min gerührt, portioniert und eingefroren.

Kopplung von P_{1-9} an KLH: Eine Portion des diazotierten Benzidins wurde mit 1 Vol. 0,5 M Borat/NaOH, pH 11, versetzt und nach 10 min bei 0°C der entstandene Niederschlag abzentrifugiert. 200 µl des Überstands wurden bei 0°C langsam zu 1 ml einer Lösung von 2 µmol Peptid und 8 mg KLH in NaOH, pH ~13, gegeben; nach 2 h bei 0°C wurde der Ansatz dialysiert (s.Abschn.2.2.2.1.).

Kopplung von Tyr-$P_{130-140}$ an KLH: Zu 2,75 ml einer Lösung von Peptid (1 µmol) und KLH (5 mg) in Borat-Saline wurden 200 µl neutralisiertes *bis*-Diazobenzidin (1 Vol. diazotiertes Benzidin + 1 Vol. 0,5 M Borat/NaOH, pH 8,5) gegeben, 3 h bei 0-4°C gerührt und dialysiert(s.o.).

2.2.2.3. Peptid-Protein-Kopplung mit Carbodiimid (71)

Zur Kopplung von $P_{125-135}$ und $P_{132-144}$ an die Träger zur Immunisierung wurden 1 - 2 µmol Peptid, 2 - 6 mg KLH bzw. Polylysin und 100 mg *N*-Ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid-hydrochlorid in 0,5 - 1 ml 0,1 M Phosphatpuffer, pH 6, 2 h bei Raumtemperatur und über Nacht bei 4°C

gerührt (Dialyse und Ausbeutebestimmung s.Abschn.2.2.2.1.).

P_{1-9} (5 µmol) wurde mit dem Carbodiimid (100 mg) in 1 ml HCl (pH 3) voraktiviert, in eine Lösung von 2 mg Polylysin in 3 ml DMF/H_2O/Triethylamin (9:9:2) gegeben und die Lösung über Nacht bei Raumtemperatur gerührt. Der Kopplungsansatz wurde über 2 Tage gegen 3 x 2 l H_2O und 3 x 2 l PBS dialysiert. Die Kopplungsausbeute betrug weniger als 10 %, das Kopplungsprodukt zeigte jedoch im ELISA eine deutliche Reaktion mit den Antiseren gegen die Benzidin- und Glutaraldehyd-Kopplungsprodukte von P_{1-9}.

2.2.2.4. Immunisierung

Die Immunogene wurden jeweils in ca. 1 ml PBS verdünnt und mit dem gleichen Volumen Freunds kompletten Adjuvans (CFA) oder inkompletten Adjuvans (ICFA) emulgiert. Die Immunisierungsprotokolle für die 9 verwendeten Kaninchen sind in Tab.3 zusammengefaßt. Die Applikation erfolgte intradermal (i.d.) an vielen Stellen auf dem Rücken, subcutan (s.c.) in die Laufbeugen, intramuskulär (i.m.) in die hinteren Oberschenkel oder intraperitoneal (i.p.). Die Kaninchen wurden jeweils ab dem 8. Tag nach der letzten angegebenen Injektion aus der Ohrvene geblutet.

8 Mäuse wurden mit je 20 µg des Carbodiimid-Konjugats von P_{1-9} in PBS/CFA und mit der gleichen Menge in PBS/ICFA (am 25. Tag) immunisiert und am Tag 40 aus der Schwanzvene geblutet.

2.2.3. Antikörperpräparation

2.2.3.1. Gewinnung von Seren und IgG (72)

Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde geronnenes Blut über Nacht bei 4°C aufbewahrt, um eine Kontraktion des Blutkuchens zu ermöglichen, das Serum abgenommen und 15 min bei 2 000 x g zentrifugiert.

Tabelle 3 : Immunisierungsprotokolle der Kaninchen

Kaninchen	Tag	Antigen (Kopplungsreagens*)	Menge(mg)	Adjuvans	Applikation
10,11	1	$P_{408-417}$-KLH (GA)	0,5	CFA	i.d./s.c.
	23	$P_{408-417}$-KLH (GA)	0,5	ICFA	s.c./i.m.
15	1	P_{1-9}-KLH (BDB)	0,7	CFA	i.d./s.c.
	29	P_{1-9}-KLH (BDB)	0,7	ICFA	s.c./i.m.
16	1	P_{1-9}-KLH (GA)	0,35	ICFA	i.d./s.c.
23	1	$P_{132-144}$-KLH (GA)	0,5	CFA	s.c./i.m.
24	1	$P_{132-144}$-KLH (CD)	0,65	CFA	s.c./i.m.
	34	$P_{132-144}$-PolyLys (CD)	0,35	ICFA	s.c./i.m.
	67	$P_{132-144}$-PolyLys (CD)	0,2	ICFA	s.c./i.m.
	115	$P_{132-144}$-PolyLys (CD)	0,5	ICFA	s.c./i.m.
27	1	$P_{125-135}$-KLH (CD)	0,5	CFA	s.c./i.m.
	55	$P_{125-135}$-PolyLys (CD)	0,2	ICFA	s.c./i.m.
28	1	$P_{125-135}$-KLH (GA)	0,5	CFA	s.c./i.m.
34	1	Dimyristoyl-Lys-Gly_2-$P_{130-140}$	1,0	CFA	s.c./i.m.
	23	Dimyristoyl-Lys-Gly_2-$P_{130-140}$	1,0	ICFA	s.c./i.m.
	38	Tyr-$P_{130-140}$-KLH (BDB)	1,0	ICFA	s.c./i.m.
	59	Tyr-$P_{130-140}$-KLH (BDB)	1,0	-	i.p.

* GA = Glutaraldehyd, BDB = diazotiertes Benzidin, CD = wasserlösl. Carbodiimid

Eine γ-Glubulinfraktion aus Serum wurde durch Ammoniumsulfat-Präzipitation bei 40 % Sättigung gewonnen, IgG daraus durch Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose gereinigt (10 mM Natriumphosphat, pH 8, Säulendurchlauf).

2.2.3.2. Papainspaltung von IgG und F_{ab}-Reinigung (73,74)

Papain (10 mg/ml) wurde in 50 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA, 20 mM β-Mercaptoethanol, pH 6, 15 min bei Raumtemperatur voraktiviert und 20 µl dieser Lösung zu 20 mg IgG in 1,5 ml PBS und 0,1 ml 0,5 M Na-Acetat, 10 mM EDTA, 20 mM Cystein, pH 6, gegeben. Nach 90 min bei 37°C wurde die Spaltung durch 200 µl 20 mM *p*-Hydroxymercuribenzolsulfonat gestoppt und der Ansatz über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Na-Acetat, pH 5,5, dialysiert. Der entstandene Niederschlag wurde abzentrifugiert und der Überstand auf eine, mit dem gleichen Puffer äquilibrierte CM-Cellulose-Säule (0,5 x 40 cm) aufgetragen. F_{ab} eluierte unter diesen Bedingungen im Durchlauf und kurz nach Anlegen eines Gradienten von 0,01 - 0,3 M Na-Acetat, pH 5,5 (74).

2.2.3.3. Immobilisierte Peptide für die Affinitätschromatographie

$P_{125-135}$, $P_{130-140}$ und $P_{408-417}$ wurden nach Vorschrift des Herstellers (75) an aktivierte Carboxyhexyl-Sepharose gekoppelt. Die Kopplungsausbeuten betrugen 75 - 90 %, der erzielte Substitutionsgrad lag bei 1,5 - 2 µmol Peptid pro ml Gel.

Die Immobilisierung von P_{1-9} erfolgte an Diazoniumphenyl-SP500, einem aktivierten Polyolderivat von Kieselgel (76): 6 µmol P_{1-9} und 1 g Diazoniumphenyl-SP500 wurden in 4 ml DMF/H_2O (1:1) für 5 min am Rotationsverdampfer evakuiert und für weitere 2 h ohne Vakuum rotiert (20°C). Überschüssige Azogruppen wurden mit Tyrosin blockiert,

das Harz wurde gründlich mit Borat-Saline, 0,05 % Triton X-100 (pH 8,5) gewaschen und von einem Aliquot das gebundene Peptid mit 0,1 M $Na_2S_2O_3$ in Borat-Saline eluiert. Der Substitutionsgrad, berechnet aus der eluierten Radioaktivität, betrug ca 0,1 µmol Peptid pro ml Harz.

2.2.3.4. Affinitätschromatographische Reinigung peptidspezifischer Antikörper

Die γ-Globulinfraktion aus 2 - 3 ml Antiserum (aufgenommen im ursprünglichen Volumen und dialysiert gegen PBS, 5 mM NaN_3 oder gegen 10 mM Na-Borat, 150 mM NaCl, pH 8,4) wurde mit dem entsprechenden Peptidharz (200 µl Bettvolumen) über Nacht bei 4°C unter kontinuierlicher Bewegung inkubiert, das Harz in eine kleine Säule gegeben (0,3 - 0,6 cm ∅) und mit Borat-Saline, 0,05 % Triton X-100, mit Borat-Saline, mit 0,1 M Tris/HCl, 0,5 M NaCl, pH 8,0 und schließlich mit 10 mM Na-Phosphat, pH 6,0 gewaschen. Die Elution von den Peptid-Sepharose-Derivaten erfolgte mit 0,8 - 1,0 ml 0,2 M Glycin/HCl, pH 2,5; für die Elution der Antikörper gegen P_{1-9} vom Diazoniumphenyl-SP500-Derivat enthielt der Glycinpuffer zusätzlich 0,05 % Tween 20. Die Eluate wurden sofort mit 0,5 M Na-Borat, pH 8,5 neutralisiert, gegen PBS oder 10 mM Na-Borat, 150 mM NaCl, pH 8,4 dialysiert und nach Zugabe von BSA (2 mg/ml) portioniert und eingefroren.

2.2.4. Markierung von Antikörpern

2.2.4.1. Jodierung von peptidspezifischen Antikörpern

Die Präparation von peptidspezifischen, ^{125}J-markierten Antikörpern erfolgte durch Kombination von Affinitätschromatographie und *in situ*-Radiojodierung (77,78) des an Peptid-Sepharose gebundenen IgG oder F_{ab}.

$P_{408-417}$- bzw. $P_{125-135}$-Sepharose (25 µl Bettvolumen)

wurde in 50 mM Glycin/HCl, pH 2,5 gewaschen und nach Neutralisierung mit PBS mit F_{ab} (0,8 mg) oder IgG (5 mg) aus Serum gegen $P_{408-417}$ bzw. γ-Globulinen (10 mg) aus Anti-$P_{125-135}$-Serum in 1 - 4 ml PBS inkubiert (2 - 3 h bei 20-25°C oder über Nacht bei 4°C unter kontinuierlicher Bewegung).

Das Affinitätsgel wurde gründlich mit PBS (5 x) und zuletzt mit 0,2 M K-Phosphat, pH 7,5 gewaschen und in ein neues Polystyrol-Spitzröhrchen überführt. Die Jodierung der gebundenen Antikörper erfolgte nach der Chloramin T-Methode (79). Zu 25 µl 0,2M K-Phosphat, pH 7,5, 25 µl Harz und 10 µl $Na^{125}J$ (4 MBq in NaOH, pH 11) wurden 10 µl einer frischen Lösung von Chloramin T (5 mg/ml) zugegeben, der Ansatz wurde sofort geschüttelt und die Reaktion nach 30 - 60 s durch Zugabe von 25 µl 4 mg/ml NaS_2O_5 gestoppt. Das Gel wurde in ca. 1 ml 50 mM K-Phosphat, pH 7,5, 2 mg/ml NaJ aufgenommen und auf eine Sephadex G25-Säule (0,8 x 5 cm) gegeben, die mit PBS, 1 mg/ml BSA äquilibriert war. Freies $^{125}J^-$ wurde durch Waschen mit PBS, 1 mg/ml BSA entfernt (5 x 2 ml), die markierten Antikörper wurden schließlich mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,5 (2 x 1 ml) in jeweils vorgelegte 0,3 ml 0,5 M Na-Borat, pH 8,5 eluiert.

2.2.4.2 Enzymmarkierung von Anti-$P_{408-417}$-IgG

Antikörper gegen den synthetischen C-Terminus ($P_{408-417}$) wurden nach der Perjodat-Methode (80,81) mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert: 4 mg Peroxidase (100 nmol, 1140 U) wurden in 1 ml bidest. H_2O gelöst und mit 200 µl 0,1 M $NaJO_4$ (frisch bereitet) versetzt. Nach 20 min Rühren bei Raumtemperatur wurden 100 µl Ethylenglycol zugegeben, um überschüssiges Perjodat zu inaktivieren (weitere 5 min Rühren). Schließlich wurde die aktivierte Peroxidase durch Gelchromatographie an Sephadex G25 (1,7 x 28 cm Säule, 1 mM Na-Acetat, pH 4,3) von den Reagentien getrennt. Die grünbraunen Fraktionen des Säuleneluats

(2,5 ml) wurden zu 7 mg IgG aus Anti-$P_{408-417}$-Serum (=50 nmol IgG in 500 µl 150 mM NaCl) gegeben, mit 150 µl 500 mM Na-Carbonat, pH 9,5 versetzt und 2 h bei Raumtemperatur gerührt. Nach Abkühlung auf 0°C wurden zur Reduktion der gebildeten Schiff'schen Basen 50 µl 4 mg/ml $NaBH_4$ (frisch bereitet) zugegeben. Nach weiteren 60 min Rühren bei 0-4°C wurde schließlich gegen PBS dialysiert. Die Reinigung der peptidspezifischen Konjugate erfolgte durch Affinitätschromatographie an $P_{408-417}$-CH-Sepharose (200 µl Bettvolumen, ca. 0,4 µmol Peptid, vergl.Abschn.2.2.3.3.). Nach Inkubation mit dem Dialysat für 1 h bei Raumtemperatur unter kontinuierlicher Bewegung wurde das Affinitätsgel mit je 3,5 ml 0,05 % (v/v) Tween 20 in PBS (2 x), PBS und 10 mM Na-Phosphat, pH 6,0 gewaschen und die peptidspezifischen Konjugate mit 2 x 2 ml 50 mM Glycin/HCl, pH 2,5 eluiert. Das Eluat wurde mit 1 M Tris/HCl, pH 9 neutralisiert, mit 2 mg/ml BSA versetzt, über Nacht gegen 10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7,5 dialysiert und in Portionen eingefroren. Die gereinigten Peroxidase-Konjugate regierten spezifisch mit dem Lactose:H^+-Carrier im Immunoblot und mit $P_{408-417}$-CH-Sepharose.

2.2.5. Immunchemische Testsysteme

2.2.5.1. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Reaktivität von Antiseren und gereinigten Antikörpern mit den Peptiden wurde im indirekten ELISA untersucht (82,83).

Zur Beschichtung von Mikrotiterplatten aus Polyvinylchlorid (Dynatech, Denkendorf; 96 Vertiefungen à 250 µl, Flachboden) mit den freien Peptiden wurden pro Vertiefung ca.100 pmol Peptid aus 25 - 50 µl wässriger Lösung über Nacht bei 37-42°C eingetrocknet. Mit dem $P_{408-417}$-BSA-Konjugat (0,2 µg in 50 µl Borat-Saline pro Vertiefung) wurden die Platten durch Inkubation in einer feuchten Kammer (2 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C) beschichtet. Die Vertie-

fungen wurden mit je 200 µl 20 mg/ml BSA in Borat-Saline gefüllt, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, die Mikrotiterplatten mit Parafilm verschlossen und bei 4°C gelagert.

Vor Gebrauch und zwischen den einzelnen Inkubationen wurden die Platten jeweils 2 - 3 mal mit 0,05 % Triton X-100 in Borat-Saline und mit Borat-Saline gewaschen. Die Inkubationen mit Verdünnungsserien der Antiseren (bzw. der gereinigten Antikörper) und mit den Indikatorantikörpern (Alk. Phosphatase-Konjugat von Ziege-Anti-Kaninchen-IgG, 1:1000 - 1:2000) erfolgten jeweils 1 - 3 h bei 37°C oder über Nacht bei 4°C (100 µl pro Vertiefung; alle Verdünnungen in Borat-Saline, 1 mg/ml BSA). Die Platten wurden wie oben beschrieben und zuletzt mit Substratpuffer (50 mM Na-Carbonat, 2 mM $MgSO_4$, pH 9,5) gewaschen und die Vertiefungen mit 100 µl 1 mg/ml *p*-Nitrophenylphosphat in Substratpuffer gefüllt. Nach 10 - 30 min bei Raumtemperatur wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 3 N NaOH oder je 25 µl 0,1 M EDTA und 5 N NaOH gestoppt. Die Extinktionen wurden entweder direkt an einem automatischen Mikrotiterplatten-photometer (Dynatech) oder nach Verdünnen (1:3 - 1:8) mit 0,5 N NaOH im Spektralphotometer bei 405 nm gegen einen Leerwert (kein erster Antikörper oder 1:20 000 Verdünnung des Präimmunserums) gemessen. Als Titer eines Antiserums wurde die Verdünnung festgelegt, bei der die Extinktion doppelt so hoch war wie bei der höchsten Konzentration (1:10 Verdünnung) des Präimmunserums im ELISA gegen das entsprechende Peptid oder des Antiserums in antigenfreien Vertiefungen.

2.2.5.2. Elektrophorese und Immunoblot

E.coli-Membranen wurden durch Zugabe von 1/10 bis 1/5 Vol. Probenpuffer (3,8 mg/ml LiDS, 0,1 mg/ml Bromphenolblau, 0,4 M Tris/HCl, 45 % (v/v) Glycerol, pH 6,5) und kurzes Beschallen aufgelöst und die Membranproteine auf einem 1,3 mm dicken, diskontinuierlichen Polyacrylamidgel

(Trenngel 10,8 % Acrylamid, 0,3 % *N,N'*-Methylenbisacrylamid) in Gegenwart von SDS aufgetrennt (84) und anschliessend elektrophoretisch auf einen Nitrocellulosefilter übertragen (85,86). Der Transfer erfolgte für 2 h bei 10 - 12 V in 25 mM Na-Phosphat, pH 6,5 oder bei 20 - 25 V in 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20 % Methanol, 1 g/l Lubrol PX unter Eiskühlung und bei einem Elektrodenabstand von 2,5 cm.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde der Nitrocellulosefilter für 30 - 60 min bei 37°C in 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl, 0,05 % Tween 20, pH 7,5 gebadet; der gleiche Puffer wurde zum Verdünnen der Antikörper und zum Waschen verwendet (87). Soweit in den Legenden der Abbildungen nichts Anderes angegeben ist, wurde der Filter jeweils bei 37°C unter leichtem Schütteln 30 - 60 min mit ca. 25 ml Antiserumverdünnung (1:100 - 1:500) inkubiert, gefolgt von 2x30 min Waschen (ca.100ml), 30-60 min Inkubation mit ca. 25 ml Indikatorantikörper-Verdünnung und 60 min Waschen (ca. 250 ml). Als Indikatorantikörper wurden mit Meerrettich-Peroxidase oder Alkalischer Phosphatase markierte Ziegenantikörper gegen Kaninchen-IgG in Verdünnungen von 1:200 - 1:500 bzw. 1:500 - 1:1500 verwendet. Um die gebundenen Antikörper sichbar zu machen, wurde der Nitrocellulosefilter schließlich mit einem chromogenen Substrat für das konjugierte Enzym inkubiert. Die Substratlösung für Peroxidase bestand aus 25 ml 0,1 M K-Phosphat, pH 7,5, 6 ml 3 mg/ml 4-Chlor-1-naphthol in Ethanol und 25 µl 30 % H_2O_2 (88), die für die Phosphatase-Konjugate aus 20 ml 50 mM Na-Carbonat, 2 mM $MgSO_4$, pH 9,5, 2 ml 1 mg/ml Nitro-Blautetrazolium und 0,2 ml 5 mg/ml 5-Brom-4-chlorindoxylphosphat (letzteres in DMF, vergl. (89)).

2.2.5.3. Immunpräzipitation

Radioaktiv markierte Membranen wurden mit 10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0 auf 50 - 100 µl verdünnt (Proteinkonzentration ca. 0,1 mg/ml) und durch rasche Zugabe von 1 Vol. 10 mg/ml Dodecylmaltosid im gleichen Puffer solubi-

lisiert (24). Nach kurzem Beschallen im Ultraschallbad wurde 15 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Aliquots des Überstands (10 - 25 µl), der 80 - 95 % der Radioaktivität enthielt, wurden mit IP-Puffer (Immunpräzipitationspuffer: 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 20 mg/ml Glycerol, 1 mg/ml Lubrol PX, 1 mg/ml BSA, 3 mM NaN_3, pH 8,0) auf 450 µl verdünnt und mit 50 µl *S.aureus*-Suspension versetzt; die fixierten Staphylococcen (90) waren mehrfach in IP-Puffer gewaschen und zu 100 - 120 mg nasse Zellen / ml IP-Puffer aufgenommen worden. Nach 15 min Voradsorption bei 0-4°C und Sedimentation der Staphylococcen (2 min, 2 000 x g, 4°C) wurden zum Überstand bis zu 10 µl Antiserum bzw. Präimmunserum gegeben und, soweit nicht anders angegeben, 30 min bei 15-20°C und 2 - 3 h bei 4°C inkubiert. Zur Adsorption der Antikörper wurden die Proben mit 50 µl der *S.aureus*-Suspension versetzt und nach 10 min bei Raumtemperatur oder 30 min bei 0-4°C zentrifugiert (30 s, 10 000 x g). Die Präzipitate wurden mit 3 x 800 µl IP-Puffer und 2 x 800 µl desselben Puffers ohne BSA gewaschen. Zur Dissoziation der Immunkomplexe wurden die Präzipitate mit 50 µl 30 mg/ml LiDS, 4,5 % (v/v) Glycerol, 60 mM β-Mercaptoethanol, 40 mM Tris/HCl, pH 6,5) versetzt, kurz beschallt und nach 1 - 2 h bei Raumtemperatur zentrifugiert (2 min, 10 000 x g).

Nach Gelelektrophorese (s.Abschn. 2.2.5.2.) der Überstände wurden die radioaktiven Banden durch Fluorographie sichbar gemacht (91). Dazu wurde das Acrylamidgel in Essigsäure entwässert (2 x 15 min), 90 min mit 2,5-Diphenyloxazol (20 % in Essigsäure) behandelt und schließlich der Szintillator im Gel mit Wasser präzipitiert (30 min). Das Gel wurde auf Filterpapier aufgetrocknet (2 - 3 h bei 60-80°C), die Fluorographie erfolgte mit vorgeblitztem Dupont Cronex 4 Röntgenfilm bei -70°C.

2.2.5.4. Immunfluoreszenz

Zur Gegenfärbung mit Rhodamin wurden die durch osmotische Lyse (92) präparierten Membranvesikel von *E.coli* ML308-225 in 0,1 M Na-Carbonat, pH 8 aufgenommen (ca. 1 mg Membranprotein/ml) und mit 1 Tropfen (ca. 20 µl) Rhodaminisothiocyanat-Lösung (ca. 0,1 mg/ml in Aceton) versetzt. Nach 1 h bei 0°C wurden die Vesikel sedimentiert (15 min, 10 000 x g), im gleichen Puffer vorsichtig resuspendiert und über Nacht mit 0.5 % Formaldehyd bei 4°C fixiert. Überschüssiger Aldehyd wurde mit 0,1 M Glycin, 12 mM Tris abgesättigt (2 h, 4°C), die Vesikel abzentrifugiert (15 min, 10 000 x g) und in 20 mM K-Phosphat, pH 6,6 gewaschen.

Die vormarkierten Vesikel wurden in 2,5 ml 20 mg/ml BSA aufgenommen, als dünner Film auf Immunfluoreszenz-Objektträger (Flow-Labs, Meckenheim) aufgetragen und bei 37°C 1 h getrocknet. Zur Markierung der exponierten C-Termini wurde je 15 min bei Raumtemperatur mit Anti-$P_{408-417}$-Serum (1:500) und Fluorescein-markiertem Ziege-anti-Kaninchen-IgG (1:200, Antikörper-Verdünnung jeweils in PBS, 1 mg/ml BSA) inkubiert, jeweils gefolgt von 15 min Waschen mit PBS. Zuletzt wurden die Proben in Glycerol/PBS 1:1 eingebettet. Jeweils gleiche Ausschnitte der Proben wurden am Fluoreszenzmikroskop im Rhodamin- und Fluorescein-Kanal auf Kodak Tri X Pan fotografiert.

2.2.5.5. Bindung von markierten Antikörpern an Vesikel

Mit ^{125}J-markiertem IgG oder F_{ab} wurden Membranvesikel oder rekonstituierte Proteoliposomen in einem konstanten Volumen Borat-Saline, 1mg/ml BSA inkubiert (s.Legenden). Die Vesikel wurden zusammen mit den gebundenen Antikörpern durch Ultrazentrifugation (Beckman Airfuge, 20 min bei 110 000 x g) oder nach Zugabe von 150 µl 2 mg/ml Protaminsulfat in PBS und weiteren 10 min bei Raumtemperatur bei 10 000 x g (15 min) sedimentiert; Protamin bewirkt die Aggregation von Membranvesikeln und Proteoliposomen (24).

Die Überstände wurden abgesaugt und die Röhrchen in einen γ-Szintillationszähler überführt, um die in den Niederschlägen gebundene Radioaktivität zu bestimmen.

Zur Bestimmung des relativen Carriergehalts von Rohmembranen aus der Bindung von enzymmarkierten Antikörpern wurden Membranvesikel aus beschallten Zellen (50 µg Membranprotein) mit Peroxidase-anti-$P_{408-417}$-IgG (1:10) in 120 µl PBS, 30 mg/ml BSA für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert, durch Ultrazentrifugation (s.o.) sedimentiert und die Überstände abgenommen. Die Niederschläge wurden kurz mit PBS abgespült, in 120 µl PBS durch Beschallen resuspendiert und je 100 µl der Suspension mit 1 ml Peroxidase-Substratlösung (0,05 mg/ml *o*-Phenylendiamin, 0,03 % H_2O_2 in 0,1 M K-Phosphat, pH 6,6) versetzt, die Reaktion nach 10 min bei Raumtemperatur durch Zugabe von 200 µl 4 N H_2SO_4 gestoppt und die Absorption bei 492 nm gegen H_2O gemessen.

2.2.6. Präparation von Membranen und Proteoliposomen

2.2.6.1. ^{14}C- und ^{35}S-markierte Rohmembranen

E.coli T184 (*lacY*$^+$) und T206 (*lacY*$^-$) wurden über Nacht in T31RT-Medium (für T184 ohne Tetracyclin) angezogen (17,24).

Für die ^{14}C-Markierung wurden je 10 ml der exponentiell wachsenden Kultur ($A_{420} \approx 0,5$) abgenommen und mit 0,9 MBq [^{14}C]Aminosäuremischung bei 37°C weiter geschüttelt; in T206 wurde gleichzeitig die Carrier-Synthese mit 2×10^{-4}M IPTG induziert.

Für die ^{35}S-Markierung wurden die Zellen aus den Über-Nacht-Kulturen bei $A_{420} \approx 0,5$ geerntet, in Cohen-Rickenberg-Medium (CR) mit 1 mM $MgSO_4$ gewaschen (3x) und mit den gewaschenen Zellen je 10 ml T31RT-Medium (für T184 ohne Tetracyclin, für T206 mit 2×10^{-4}M IPTG) angeimpft, in dem die Methioninkonzentration auf 5 µg/ml reduziert und das mit L[^{35}S]Methionin (1,5 MBq/10 ml) supplementiert war ($A_{420} \approx 0,4$).

Nach 4 - 5 h wurden die Zellen geerntet ($A_{420} \approx 1,5$), zweimal in CR, 1mM $MgSO_4$ gewaschen, in 2,5 ml 20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, pH 8 aufgenommen und 3 min bei 0°C in 15 ml - Corex-Röhrchen am Branson-Sonifier beschallt (konische Spitze, Leistungsaufnahme 30 W). Die nahezu durchsichtigen Proben wurden mit weiteren 2,5 ml Puffer versetzt und zur Entfernung von ganzen Zellen und großen Zelltrümmern 10 min bei 2 000 x g zentrifugiert. Die Rohmembranen wurden aus den Überständen in der Ultrazentrifuge sedimentiert (60 min, 100 000 x g) und mit 10 mM Tris/HCl, pH 8,0 gewaschen. Die Niederschläge wurden in 100 µl H_2O durch Beschallen resuspendiert und in Portionen bei -70°C gelagert.

2.2.6.2. Sonstige Membranvesikel und Proteoliposomen

Membranvesikel mit nativer Orientierung ("right-side-out") wurden nach Kaback (92) präpariert und durch kurzes Beschallen (93) in invertierte Vesikel umgewandelt. Dazu wurden die Vesikel in 2,5 ml - Portionen in konischen Zentrifugenröhrchen unter Eiskühlung 4 x 15 s mit der konischen Spitze bei 25 W am Branson-Sonifier beschallt.

Rohmembranvesikel durch Lyse unter hohem Druck (94), cytoplasmatische Membranvesikel (11,17,95) und rekonstituierte Proteoliposomen (10,11,21-24) wurden wie beschrieben präpariert.

2.2.7. Protease-Behandlung von Membranen und Proteoliposomen

2.2.7.1 Behandlung mit Carboxypeptidase A (94)

Zur Abspaltung exponierter C-Termini auf Membranvesikeln oder Proteoliposomen wurden diese in 20 mM Tris/HCl, 0,3 mM $CoCl_2$, pH 8,0 suspendiert (2 - 8 mg Membranprotein pro ml) und mit 1/100 Vol. 2 mg/ml Carboxypeptidase A in 0,1 M NaCl, 30 mM Tris/HCl, 0,3 mM $CoCl_2$, pH 7,8 versetzt.

Nach 30 - 60 min bei 25-30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/10 Vol. 50 mM EDTA, 75 mM ß-Mercaptoethanol gestoppt. Frühestens nach weiteren 10 min wurden die Membranen in Elektrophorese-Probenpuffer (s.Abschn.2.2.5.2.) aufgelöst.

2.2.7.2. Spaltung mit Thermolysin

Native und beschallte (s.Abschn.2.2.6.2.), durch osmotische Lyse präparierte Membranvesikel wurden in 20 mM Tris/HCl, 0,1 mM $CaCl_2$, pH 8,0 suspendiert und mit 1/50 Vol. 1 mg/ml Thermolysin in 50 mM NaCl versetzt. Nach 90 min bei 30-37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 1/50 Vol. 0,1 M EGTA gestoppt und nach weiteren 10 min bei 0-4°C wurden die Membranen in Elektrophorese-Probenpuffer aufgelöst (s.o.).

2.2.8. Galactosidbindung und -transport in Gegenwart von Antikörpern

2.2.8.1. Substratbindung (11)

Cytoplasmamembranvesikel des Lactose:H^+-Carrier-Überproduzenten T206 (4,1 mg Membranprotein, 10 nmol Carrier) wurden in jeweils 1 ml Anti-$P_{408-417}$-Serum oder Kaninchen-Normalserum suspendiert, nach 15 min bei Raumtemperatur für 1 min beschallt und weitere 15 min inkubiert. Die Suspension wurde mit PBS auf 5 ml verdünnt und 90 min bei 140 000 x g zentrifugiert. Nach Resuspendieren der Niederschläge in 0,5 ml 75 mM K-Phosphat, 1 mM $MgSO_4$, pH 6,4, wurde die Bindung von NpαGal an den Carrier durch Flußdialyse gemessen. Unter den Versuchsbedingungen betrug die Carrier-Konzentration 6,6 µM und die Konzentration an Anti-C-Terminus-Bindungsstellen 7,6 µM (berechnet aus der Antikörperausbeute bei Affinitätschromatographie des Serums an $P_{408-417}$-CH-Sepharose).

2.2.8.2. GalSGal-Melibiose-Gegentransport (25)

Membranvesikel, präpariert durch osmotische Lyse aus Stamm ML308-225, wurden 90 min bei Raumtemperatur in PBS, 15 mM Melibiose, 1 mM $MgSO_4$ inkubiert, 75 s beschallt und 40 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Vesikel wurden in 0,7 ml des Überstands resuspendiert, gleiche Volumina der Vesikelsuspension und von Antiserum gegen $P_{408-417}$ oder Präimmunserum gemischt und 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Für die Gegentransportmessungen wurden jeweils 50 µl des Gemischs (ca. 1 mg Membranprotein) 1:30 in PBS, 1 µM [6,6'-^{3}H]GalSGal (18,5 TBq/mol), 1 mM $MgSO_4$, 7,5 mM Glycerol verdünnt. Der Transport wurde nach 5 - 60 s durch Zugabe von 5 ml Stoppuffer beendet (0,2 M KCl, 10 mM 2(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure, 2 mM $HgCl_2$, 1 mg/ml Protamin, pH 6,0). Die Vesikel wurden auf Glasfaserfiltern gesammelt und mit 3 x 5 ml Stoppuffer gewaschen. Die gebundene Radioaktivität wurde im Flüssigszintillationszähler bestimmt. In der Stammsuspension (Vesikel-Antiserum-Gemisch) betrug die Carrier-Konzentration 3,9 µM und die Konzentration an Anti-$P_{408-417}$-Bindungsstellen 5,7 µM (vergl. Abschn. 2.2.8.1.).

2.2.9. Proteinbestimmung

Membranproteinkonzentrationen wurden in Modifikation der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (96) in Gegenwart von SDS bestimmt (97). IgG-Konzentrationen wurden durch Messung der A_{280} unter Annahme eines Extinktionskoeffizienten von $\varepsilon_{280,\ 0,1\ \%} = 1,4$ ermittelt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Synthetische Peptide

3.1.1. Auswahl der synthetischen Peptide aus der Sequenz des Lactose:H^+-Carriers

Für die Auswahl von Abschnitten aus der Aminosäuresequenz eines Proteins zur Peptidsynthese und Gewinnung von sequenzspezifischen Antikörpern wird meist ein Hydrophilizitätsprofil der Aminosäuresequenz des Proteins herangezogen (vergl. (47,48)). Dabei geht man von der Annahme aus, daß hydrophile Aminosäurereste häufig an der Oberfläche eines Proteins lokalisiert und daher für Antikörper zugänglich sind. Das meist verwendete Hydrophilizitätsdiagramm nach Hopp und Woods (98), das in Abb.6 für den Lactose:H^+-Carrier wiedergegeben ist, wurde speziell zur Vorhersage von antigenen Determinanten eines Proteins entwickelt. Ebenso wie nach dem Diagramm von Kyte und Doolittle (Abb.4) liegt danach das Hydrophilizitätsmaximum des Carriers, das nach der Vorhersage von Hopp und Woods (98) Teil einer antigenen Determinante eines Proteins sein sollte, im Bereich um Aminosäure 130 in der Aminosäuresequenz.

Dieser breite hydrophile Bereich wird in der Sequenz von zwei hydrophoben Abschnitten flankiert, die möglicherweise den hydrophoben Kern der Membran überspannen und könnte daher als hydrophile Schleife von der wässrigen Phase aus zugänglich sein. Zur chemischen Synthese wurde dieser Teil des Carriers in 3 überlappende Peptide mit je 11 - 13 Aminosäureresten unterteilt. Die Sequenz dieser Peptide ist in Tab.4 wiedergegeben.

Daneben wurden die beiden Enden der Aminosäuresequenz zur Synthese ausgewählt, die aufgrund ihrer zu erwartenden

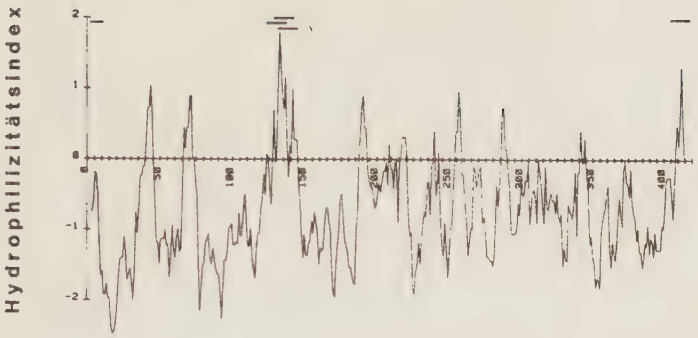


Abb.6 : Hydrophilizitätsdiagramm der Aminosäuresequenz des Lactose:H^+-Carriers nach Hopp und Woods (98)

Jeder Aminosäure wurde ein bestimmter Hydrophilizitätswert zugeordnet und die, über 6, in der Sequenz benachbarte Aminosäurereste gemittelten Werte gegen die Sequenznummer aufgetragen. Die waagrechten Balken markieren die Abschnitte des Proteins, die zur Peptidsynthese ausgewählt wurden.

Flexibilität mit Anti-Peptid-Antikörpern reagieren sollten. Wie Tab.4 zeigt (s.a.Abb.4 u.6), weisen sowohl die Hydrophilizitätsskala von Hopp und Woods als auch die Hydropathieskala von Kyte und Doolittle dem C-Terminus des Carriers überdurchschnittliche Hydrophilizität zu, während die beiden Skalan für den N-Terminus des Carriers entgegengesetzte Aussagen machen.

3.1.2. Peptidsynthese

Bei der Synthese der ausgewählten Peptide nach der Merrifield-Festphasenmethode (60,61) wurde jeweils eine ^{3}H-markierte Aminosäure eingebaut, um die Abspaltung vom

Tabelle 4 : Synthetisierte Abschnitte aus der Sequenz des Lactose:H^+-Carriers

Die Tabelle zeigt die fünf, zur Synthese ausgewählten Abschnitte der Aminosäuresequenz des Carriers und die jeweiligen Mittelwerte der Hydropathie- und Hydrophilizitätsindices der Aminosäuren. Die Hydropathieskala von Kyte und Doolittle (40) reicht von - 4,5 für Arginin bis + 4,5 für Isoleucin, während in der Hydrophilizitätsskala von Hopp und Woods (98) die Werte für die hydrophilen Aminosäuren positive Vorzeichen aufweisen (+ 3,0 für Arg bis - 3,4 für Trp). Zum Vergleich sind die entsprechenden Mittelwerte für die gesamte Sequenz des Proteins aufgeführt.

Peptid	Sequenz	Hydropathie-Index (40)	Hydrophilizitäts-Index (98)
P_{1-9}	Met-Tyr-Tyr-Leu-Lys-Asn-Thr-Asn-Phe	- 0,6	- 0,8
$P_{125-135}$	Val-Glu-Ala-Phe-Ile-Glu-Lys-Val-Ser-Arg-Arg	- 0,3	+ 0,7
$P_{130-140}$	Glu-Lys-Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Asn-Phe-Glu-Phe	- 1,4	+ 0,8
$P_{132-144}$	Val-Ser-Arg-Arg-Ser-Asn-Phe-Glu-Phe-Gly-Arg-Ala-Arg	- 1,2	+ 0,7
$P_{408-417}$	Leu-Leu-Arg-Arg-Gln-Val-Asn-Glu-Val-Ala	- 0,2	+ 0,2
Durchschnittswerte für den Lactose:H^+-Carrier		+ 0,9	- 0,8

Harz, die Aufarbeitung des Peptids sowie seine Kopplung an das immunogene Trägerprotein verfolgen zu können. Jeweils ein Aliquot der Peptide wurde mit 6 N Salzsäure hydrolysiert. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Aminosäureanalyse der sauren Hydrolysate, die für vier der fünf Pep-

Tabelle 5 : Aminosäureanalyse der Synthetischen Peptide

Die Tabelle zeigt die Aminosäurezusammensetzung der sauren Hydrolysate der synthetischen Peptide (in Klammern: Sollwerte). Die wiedergegebenen relativen Werte beziehen sich auf Alanin als Referenz. Das Ergebnis für die ^{3}H-markierte Aminosäure ist mit * markiert.

Aminosäure	P_{1-9} a)	$P_{125-135}$	$P_{130-140}$ a) b)	$P_{132-144}$	$P_{408-417}$
Ala	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Arg		1,8 (2)	2,2 (2)	2,0 (4)	1,6 (2)
Asp + Asn	2,0 (2)		1,2 (1)	0,5 (1)	1,1 (1)
Glu + Gln		2,1 (2)	2,4 (2)	0,5 (1)	2,3 (2)
Gly				0,8 (1)	
Leu	1,0 (1)*				1,7 (2)*
Lys	1,0 (1)	1,1 (1)	1,2 (1)		
Ile		1,0 (1)			
Phe	1,0 (1)	1,0 (1)	2,2 (2)	0,8 (2)	
Nle c)	1,0 (1)				
Ser		0,8 (1)	1,7 (2)	0,7 (2)	
Thr	1,1 (1)				
Tyr	2,0 (2)		0,8 (1)		
Val		2,0 (2)*	1,0 (1)*	0,4 (1)*	2,0 (2)*

a) Da bei der Synthese von P_{1-9} und $P_{130-140}$ vom Alanyl-Harz ausgegangen wurde, tragen beide Peptide ein zusätzliches Alanin am C-Terminus.

b) Bei dem zur Aminosäureanalyse eingesetzten Teil von $P_{130-140}$ wurde für die Kopplung an KLH ein zusätzliches Tyrosin am N-Terminus angefügt.

c) Norleucin wurde für Methionin eingesetzt, das Ergebnis der Aminosäureanalyse wurde mit Leucin als Standard berechnet.

tide den erwarteten Werten gut entsprachen; bei der Synthese von $P_{132-144}$ erfolgten offenbar Kettenabbrüche nach den Positionen 2 (Ala_{143}) und 4 (Gly_{141}) der Synthese.

3.2. Peptidspezifische Antiseren

3.2.1. Abhängigkeit der Immunantwort von Kopplungs- und Immunisierungsmethoden

Die Kopplung von P_{1-9}, $P_{125-135}$, $P_{132-144}$ und $P_{408-417}$ an KLH gelang mit Glutaraldehyd und diazotiertem Benzidin in hoher Ausbeute, und nach der Immunisierung mit den KLH-Konjugaten wurden durchweg rasch hohe Antikörpertiter im ELISA der Antiseren gegen die Peptide erzielt (Tab.6). Dagegen konnten bei der Carbodiimid-Kopplung nur mit Polylysin als Träger befriedigende Ausbeuten erreicht werden, und die Immunogenität der Konjugate war sehr gering.

Da bei der Konjugation durch Glutaraldehyd oder Carbodiimid eine Veränderung von, für die Immunantwort wichtigen Amino- bzw. Carboxylgruppen von Aminosäureseitenketten nicht ausgeschlossen werden kann, wurde $P_{130-140}$ spezifisch über seinen N-Terminus an immunogene Träger gekoppelt. Dazu wurden zwei Derivate des Peptids synthetisiert: Bei einer Hälfte des Syntheseansatzes wurde ein zusätzliches Tyrosin am N-Terminus angefügt und das Peptid mit diazotiertem Benzidin an KLH gekoppelt. Dem übrigen Teil des Peptids wurden zwei Glycinreste und ein mit zwei Fettsäureresten derivatisiertes Lysin angefügt. Ein solches Fettsäurederivat eines Peptids wurde von Hopp (99) erfolgreich zur Immunisierung eingesetzt. Dagegen war im Serum des mit des Dimyristoyl-Derivat von $P_{130-140}$ immunisierten Kaninchens nach zwei Injektionen der Anti-Peptid-Titer sehr gering, und erst durch zwei weitere Immunisierungen mit dem an KLH gekoppelten Tyr-$P_{130-140}$ wurde eine sehr gute Immunantwort erreicht.

Eine eindeutige Abhängigkeit der Immunantwort vom Applikationsort der Immunogene war nicht festzustellen. Mit einer Kombination von subkutaner und intramuskulärer Injektion wurden ebenso gute Ergebnisse erzielt wie mit der intradermalen Applikation. Die stärkste Steigerung eines Antikörpertiters (von 1:50 auf über 1:20 000) wurde nach Injektion des unlöslichen, stark partikulären KLH-Konjugats

Tabelle 6 : Immunogenität der Peptid-Träger-Konjugate

Peptid	Kopplung * durch	an	Kopplungs-ausbeute	Substitutionsgrad (Peptide/100000 D)	Injektionen	Anti-Peptid-Titer (ELISA)
P_{1-9}	GA	KLH	50 %	15	1	1 : 3 000
	BDB	KLH	~ 70 %	~ 10	2	1 : 4 000
	CD	PolyLys	< 10 %	~ 10	2	---**
$P_{125-135}$	GA	KLH	50 %	14	1	1 : 3 000
	CD	KLH	20 %	9	} je 1	< 1 : 20
	CD	PolyLys	40 %	15		
$P_{130-140}$	BDB	KLH	30 %	6	2***	> 1 : 20 000
$P_{132-144}$	GA	KLH	65 %	6	1	1 : 500
	CD	PolyLys	55 %	20	4	1 : 500
$P_{408-417}$	GA	KLH	50 %	8	2	> 1 : 20 000

* GA = Glutaraldehyd, BDB = diazotiertes Benzidin, CD = wasserlösliches Carbodiimid

** in keinem Serum von 8 immunisierten Mäusen konnten Antikörper nachgewiesen werden

*** nach zwei Injektionen mit dem Fettsäurederivat von $P_{130-140}$

von $P_{130-140}$ intraperitoneal und ohne Adjuvans erreicht.

3.2.2. Spezifität der Antiseren

Die gewonnenen Antiseren wurden im ELISA gegen die freien Peptide getestet, um eine peptidspezifische Immunantwort von einer Antwort gegen das eingesetzte Trägerprotein oder das Kopplungsreagens zu unterscheiden.

Dabei zeigten beide Antiseren gegen $P_{132-144}$ eine starke Kreuzreaktion mit $P_{130-140}$, während das Antiserum gegen $P_{125-135}$ nur schwach mit $P_{130-140}$ reagierte. Tab.7 zeigt die Titer der Seren im ELISA gegen $P_{130-140}$ und gegen die jeweiligen zur Immunisierung verwendeten Peptide.

Tabelle 7 : Kreuzreaktion der Antiseren gegen $P_{125-135}$ und $P_{132-144}$ mit $P_{130-140}$

Antiserum gegen *	ELISA - Titer gegen $P_{130-140}$	$P_{125-135}$	$P_{132-144}$
$P_{125-135}$ (GA,KLH)	1:40	1:3000	
$P_{132-144}$ (GA,KLH)	1:200		1:500
$P_{132-144}$ (CD)	1:500		1:500

* vergl. Tab.6

Auch $P_{132-144}$, das Peptid mit der am stärksten von den erwarteten Werten abweichenden Aminosäurezusammensetzung, rief also Antikörper hervor, die mit der Folge von Aminosäureresten reagierte, die dem entsprechenden Abschnitt der Aminosäuresequenz des Carriers entspricht. Die schwache Kreuzreaktion von Anti-$P_{125-135}$-Antikörpern mit $P_{130-140}$

läßt vermuten, daß die Mehrzahl der Antikörper gegen $P_{125-135}$ mit dem N-terminalen Teil des Peptids reagiert.

3.3. Reaktivität der Anti-Peptid-Antikörper mit dem Lactose:H^+-Carrier

3.3.1. Antikörper gegen den C-Terminus ($P_{408-417}$)

3.3.1.1. Spezifität für den Carrier in Immunoblot und Immunpräzipitation

Die Antikörper gegen den synthetischen C-Terminus ($P_{408-417}$) reagierten spezifisch mit dem Lactose:H^+-Carrier, wie der Immunoblot in Abb.7 zeigt. Unter den durch Gelelektrophorese getrennten und auf Nitrocellulose übertragenen *E.coli*-Membranproteinen banden die Antikörper gegen das Peptid an die, für den Carrier typische, breite Bande mit einem scheinbaren Molekulargewicht von M_r = 33 000 (Abb.7, Spur 2). Wurden Membranen aus dem Carrier-Überproduzenten T206 verwendet (Spur 4), so waren, neben einer starken Anfärbung des Bereichs um M_r = 33 000, Aggregate mit höherem scheinbarem Molekulargewicht sichtbar. Keine Reaktion erfolgte mit Membranproteinen aus Zellen, deren *lac*-Operon nicht induziert worden war (Spur 1), oder aus Mutanten, in denen keine Synthese des Carriers erfolgt (Spur 3, 6). Die Reaktion mit dem Carrier wurde durch das synthetische Peptid vollständig gehemmt (Spur 5).

Neben dem intakten Lactose:H^+-Carrier erkannte das Anti-C-Terminus-Serum ein proteolytisches Fragment, das im 11 % - Acrylamidgel ein scheinbares Molekulargewicht von M_r = 22 000 aufwies und in Membranen auftrat, deren Präparation nicht durchgehend bei 0-4°C erfolgte (Abb.7, Spur 4, 7). Besonders deutlich war dieses Bruchstück in Immunoblots von Membranen erkennbar, die durch Sphäroblastisierung bei Raumtemperatur und osmotische Lyse bei 37°C aus carrier-

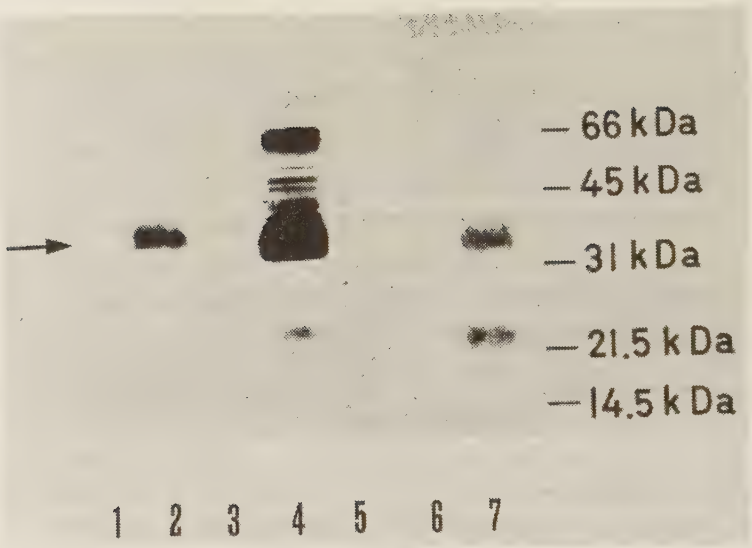


Abb.7 : Spezifität der Antikörper gegen $P_{408-417}$ für den Lactose:H^+-Carrier im Immunoblot

E.coli-Membranproteine (100 µg/Spur) wurden durch Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS aufgetrennt, elektrophoretisch auf Nitrocellulose übertragen und nacheinander mit Antiserum gegen $P_{408-417}$, Peroxidase-Anti-Kaninchen-IgG und einem chromogenen Substrat inkubiert.

Spur 1 u. 2 : Rohmembranen aus beschallten Zellen des Wildtypstammes ML30 nach Wachstum für 3 h in Gegenwart (Spur 2) und Abwesenheit (Spur 1) von $1{,}7 \times 10^{-4}$ M IPTG.

Spur 3 u. 4 : French-Press-Rohmembranen des Carrier-Überproduzenten T206 (Spur 4) und von T184 (Spur 3, kein Carrier).

Spur 5 : Wie Spur 2, jedoch Inkubation mit dem Anti-Peptid-Serum in Gegenwart von 10 µg/ml BSA-$P_{408-417}$-Konjugat.

Spur 6 u. 7 : Durch osmotische Lyse aus Sphäroblasten von ML308-225 präparierte Membranen (Spur 7, dieser Stamm produziert den Carrier konstitutiv) und ebenso präparierte Membranen aus K131 (Spur 6, kein Carrier).

produzierenden Zellen präpariert waren (Spur 7), während in Immunoblots von ebenso präparierten Membranen aus car-

rierlosen Zellen keine Anfärbung in der Region von $M_r = 22\,000$ erkennbar war (Spur 6).

Durch das Antiserum gegen $P_{408-417}$ wurde der Lactose:H^+-Carrier spezifisch und quantitativ aus detergenssolubilisierten Membranen präzipitiert (Abb.8; zur Quantifizierung des Carriers durch Immunpräzipitation vergl. Abschn. 3.4.2.1.). In Abhängigkeit von Proteinkonzentration, Temperatur und den Bedingungen der Dissoziation des Präzipitats zeigte der Carrier dabei eine starke Tendenz zur Aggregation: wurde die Immunpräzipitation bei hoher Membranproteinkonzentration und bei Raumtemperatur durchgeführt und das Präzipitat in Abwesenheit von β-Mercaptoethanol dissoziiert, blieb der Carrier fast vollständig am Übergang zwischen Sammel- und Trenngel liegen (Spur 5). Dagegen konnte bei geringer Membranproteinkonzentration die Aggregation unterdrückt werden, wenn die Immunpräzipitation bei 0-4°C durchgeführt und die Präzipitate in Gegenwart von 60 mM β-Mercaptoethanol dissoziiert wurden (Spur 1, 2).

3.3.1.2. Anti-C-Terminus-Antikörper im Antiserum gegen den gereinigten Lactose:H^+-Carrier

Um herauszufinden, ob der C-Terminus des Lactose:H^+-Carriers eine immunogene Stelle bei der Immunisierung mit dem intakten Protein darstellt, wurde ein Antiserum gegen das detergenssolubilisierte, gereinigte Protein (24) auf seinen Gehalt an Antikörpern untersucht, die mit dem synthetischen Peptid $P_{408-417}$ reagieren. Der in Abb.9 wiedergegebene ELISA zeigte, daß das Antiserum gegen den gereinigten Carrier Antikörper, die mit dem synthetischen C-Terminus reagieren, in hoher Konzentration enthielt (o-o, Titer etwa 1:3000), während das Präimmunserum keine Reaktion zeigte (x - x).

Das Antiserum gegen den gereinigten Carrier reagierte im Immunoblot nicht nur mit dem Lactose:H^+-Carrier, son-

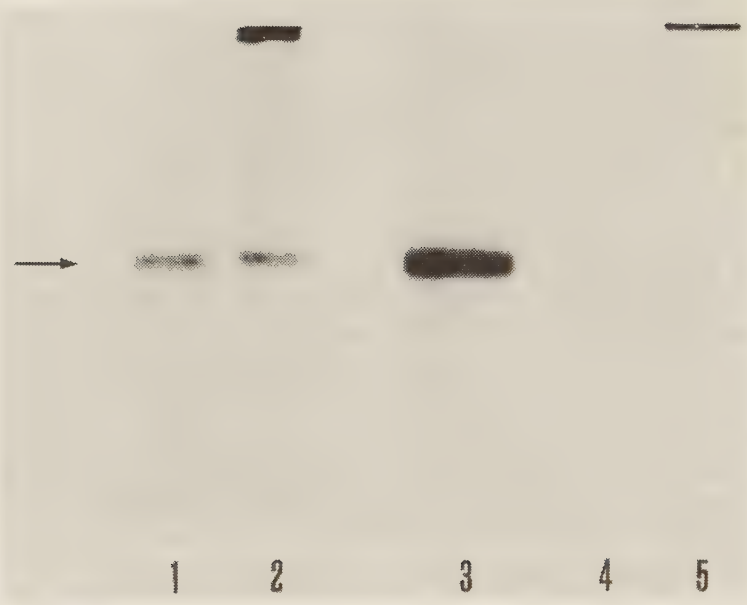


Abb.8 : Indirekte Immunpräzipitation des Lactose:H^+-Carriers durch Antikörper gegen $P_{408-417}$

Rohmembranen aus, in Gegenwart von [^{35}S]Methionin gewachsenen T206-Zellen (Spur 1, 2; ca.4 µg Protein, 80 000 cpm/Probe) oder mit [^{14}C]MalNEt markierte cytoplasmatische Membranen von T206 (Spur 4, 5; ca. 50 µg Protein, 4 000 cpm/Probe; vergl.(11)) wurden mit Dodecylmaltosid solubilisiert und mit 5 µl (Spur 1, 2) bzw. 25 µl (Spur 4, 5) Anti-C-Terminus-Serum (Spur 1, 2, 5) oder Präimmunserum (Spur 4) sowie mit 50 µl (Spur 1, 2) bzw. 250 µl (Spur 4, 5) 10 % *S.aureus*-Zellen inkubiert, die Präzipitate mehrfach gewaschen und schließlich dissoziiert, gelelektrophoretisch getrennt und fluorographiert.

Spur 2, 4, 5 : Inkubation und Waschen bei Raumtemperatur, Dissoziation in 3 % LiDS, 4,5 % Glycerol, 40 mM Tris/HCl, pH 6,5

Spur 1 : Inkubation und Waschen bei 0-4°C, Dissoziation in 3 % LiDS, 4,5 % Glycerol, 60 mM β-Mercaptoethanol, 40 mM Tris/HCl, pH 6,5

Spur 3 : 4 000 cpm [^{14}C]MalNEt-markierte Ausgangsmembran (11), solubilisiert in 0,4 % LiDS, 4,5 % Glycerol, 40 mM Tris/HCl, pH 6,5

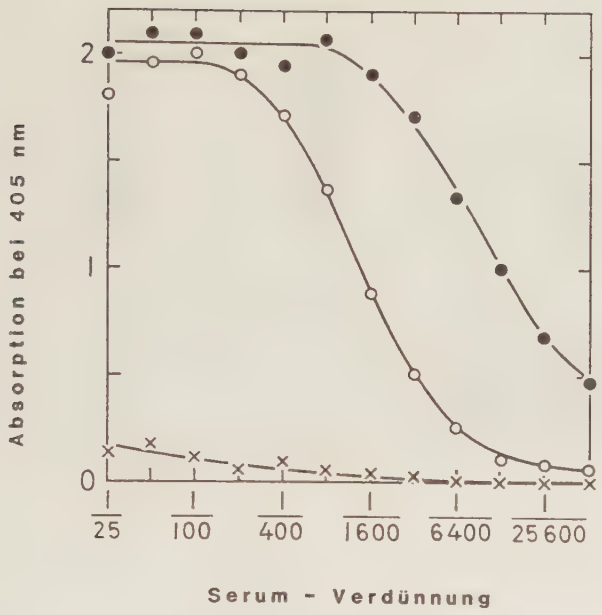
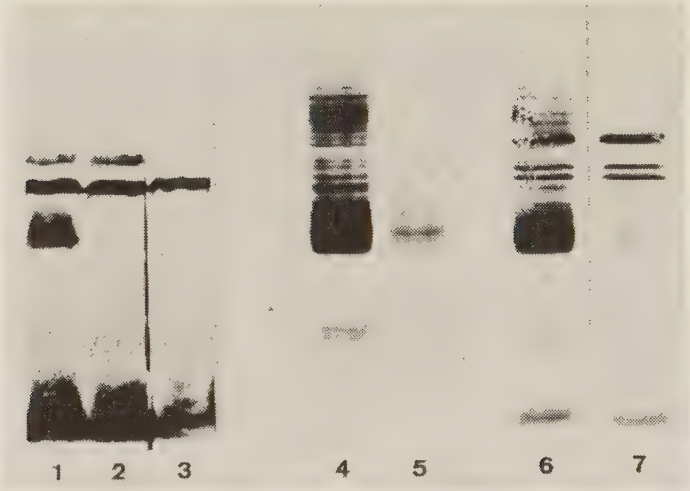


Abb.9 : Antikörper gegen den C-Terminus im Antiserum gegen den gereinigten Lactose:H^+-Carrier

Mit BSA-$P_{408-417}$-Konjugat beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit Verdünnungen von Antiseren gegen $P_{408-417}$ (● - ●) und gegen den gereinigten Lactose:H^+-Carrier (o - o), sowie eines Präimmunserums (x - x) inkubiert, gefolgt von Alk.Phosphatase-Anti-Kaninchen-IgG sowie *p*-Nitrophenylphosphat als chromogenem Substrat. Nach Stoppen der Reaktion wurde die Absorption der 1:2,5 verdünnten Proben bei 405 nm gemessen.

dern auch mit einer Reihe weiterer Proteine, die in geringem Ausmaß als Verunreinigungen in der Carrierpräparation enthalten waren, die zur Immunisierung verwendet wurde (Abb.10, Spur 1, 2). Durch Behandlung des Anti-Carrier-Serums mit dem BSA-$P_{408-417}$-Konjugat wurde die Reaktion des Serums mit dem Carrier so stark gehemmt, daß im Immunoblot nur noch eine Reaktion mit den Verunreinigungen erkennbar war



Carrier	+	-	+	++	++	++	++
CPA	-	-	-	-	+	-	+
$P_{408-417}$	-	-	+	-	-	-	-
Serum	Anti-Carrier			Anti-$P_{408-417}$		Anti-Carrier	

Abb.10 : Hemmung der Reaktivität des Antiserums gegen den gereinigten Lactose:H^+-Carrier durch $P_{408-417}$ und Carboxypeptidase A

Immunoblot der Proteine von Rohmembranen aus induzierten (Spur 1, 3) und nicht induzierten (Spur 2) ML30-Zellen, sowie von unbehandelten (Spur 4, 6) und mit CPA behandelten (Spur 5, 7) cytoplasmatischen Membranen des Carrier-Überproduzenten T206.

Spur 1 - 3 : Inkubation mit nicht absorbiertem Anti-Carrier-Serum (1:100) in Gegenwart (Spur 3) und Abwesenheit (Spur 1, 2) von 10 µg/ml BSA-$P_{408-417}$-Konjugat.

Spur 4, 5 : Inkubation mit Antiserum gegen den synthetischen C-Terminus $P_{408-417}$ (1:200)

Spur 6, 7 : Inkubation mit Anti-Carrier-Serum (1:200), aus dem Antikörper gegen Verunreinigungen durch Absorption mit carrier-defizienten Membranvesikeln entfernt wurden.

(Abb.10, Spur 3). Ebenso wurde durch eine Abspaltung des C-Terminus des Carriers mit Carboxypeptidase A (CPA) nicht nur die Reaktion des Anti-$P_{408-417}$-Serums (Spur 4, 5), sondern auch die Reaktion des Anti-Carrier-Serums mit dem Lactose:H^+-Carrier vollständig unterdrückt (Spur 6, 7).

Diese Ergebnisse zeigen, daß dieses Antiserum gegen den solubilisierten und gereinigten Lactose:H^+-Carrier praktisch ausschließlich gegen den C-Terminus des Proteins gerichtet ist und daß dieses immunodominante Epitop des Carriers durch Behandlung mit CPA entfernt werden kann, was die Bestimmung der Orientierung des Carriers (Abschn. 3.4.1.) ermöglichte.

3.3.1.3. Lokalisierung des C-Terminus' des Lactose:H^+-Carriers in der cytoplasmatischen Membran

Durch Inkubation des Antiserums gegen $P_{408-417}$ mit carrierhaltigen Membranvesikeln und anschließenden ELISA wurde untersucht, ob die Anti-Peptid-Antikörper an den membrangebundenen Carrier banden. Dabei konnten durch Absorption mit Membranen des Carrier-Überproduzenten T206 die Anti-Peptid-Antikörper nahezu vollständig aus dem Antiserum entfernt werden (Abb.11, vergl. o - o mit • - •), während nach Inkubation mit Membranen aus T184, die keinen Carrier enthalten, keine wesentliche Verringerung des ELISA-Titers beobachtet wurde (x - x). Die Antikörper gegen $P_{408-417}$ waren daher geeignet, die Seite der cytoplasmatischen Membran von *E.coli* zu bestimmen, auf der der C-Terminus des Carriers exponiert ist.

Dazu wurden peptidspezifische monovalente Antikörperfragmente (F_{ab}) aus dem Antiserum präpariert und radioaktiv markiert. Die IgG-Fraktion aus Antiserum gegen $P_{408-417}$ wurde mit Papain behandelt, die F_{ab}-Fragmente durch Ionenaustauschchromatographie gereinigt und mit dem an CH-Sepharose immobilisierten Peptid inkubiert. Nach Waschen des Affinitätsgels wurde das gebundene F_{ab} *in situ* mit radioaktivem Jod markiert und durch einen pH-Sprung von der

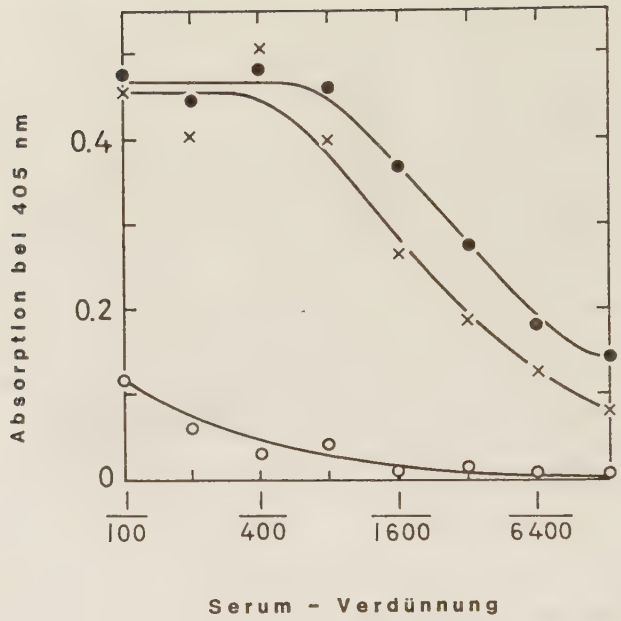


Abb.11 : Reaktivität der Antikörper gegen $P_{408-417}$ mit dem membrangebundenen Lactose:H^+-Carrier

Antiserum gegen $P_{408-417}$ wurde in Borat-Saline, 1 mg/ml BSA (500 µl) 1:25 verdünnt und mit 500 µl einer Suspension von cytoplasmatischen Membranvesikeln (1,2 mg Membranprotein in 10 mM Tris/HCl, pH 7,5) des Carrier-Überproduzenten T206 (o - o), sowie des Kontrollstammes T184 (x - x) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Membranen wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert (Beckman airfuge, 30 min, 110 000 x g), und serielle Verdünnungen der Überstände wurden im Vergleich zu entsprechenden Verdünnungen des nicht absorbierten Antiserums (● - ●) im ELISA gegen das BSA-$P_{408-417}$-Konjugat getestet.

Peptid-Sepharose eluiert. Mehr als 80 % der eluierten radioaktiven Antikörper banden an immobilisiertes $P_{408-417}$.

Nach der Methode von Kaback (92) durch osmotische Lyse von Sphäroblasten präparierte Membranvesikel haben über-

wiegend eine Orientierung, die der intakter Zellen entspricht, d.h. ihre Außenseite entspricht der dem Periplasma zugewandten Seite der cytoplasmatischen Membran (100). Durch kurzes Beschallen kann die Orientierung dieser Vesikel umgekehrt werden (93); die auf den beschallten Vesikeln zugängliche Oberfläche entspricht somit der Seite der Cytoplasmamembran, die dem Zellinnern von *E.coli* zugewandt ist.

Beschallte Vesikel von *E.coli* ML308-225, der den Lactose:H^+-Carrier konstitutiv produziert, banden mehr als 10 mal so viel radioaktiv markierte, für den C-Terminus spezifische F_{ab}-Fragmente wie frisch präparierte native Vesikel (Abb.12, A). Dagegen zeigten native und beschallte Vesikel des carrier-defizienten Stammes K131 keinerlei Bindung von Radioaktivität, die sich vom Hintergrund der Bindung an die Zentrifugenröhrchen abhob. Die an ML308-225-Vesikel gebundene Radioaktivität war abhängig von der Dauer der Beschallung (Abb.12, B) und zeigte eine Sättigung bei 60 s. Diese Beschallungszeit ist nötig, um die Fähigkeit solcher Vesikel zum durch die Atmungskette getriebenen aktiven Transport um etwa 99 % zu verringern (93). Die Bindung radioaktiv markierter, für den synthetischen C-Terminus spezifischer F_{ab}-Fragmente an invertierte, nicht aber an Vesikel mit nativer Orientierung zeigt, daß der C-Terminus des Lactose:H^+-Carriers auf der dem Zellinnern des Bakteriums zugewandten Seite der Cytoplasmamembran von *E.coli* lokalisiert ist.

Daß die zwar geringe, aber deutlich über der unspezifischen Bindung liegende Reaktion des peptidspezifischen F_{ab} mit den nicht beschallten Vesikeln (● - ● in Abb.12, A) auf einen kleinen Anteil von invertierten Vesikeln in der Präparation zurückzuführen war, zeigte die Immunfluoreszenzaufnahme, die in Abb.13 wiedergegeben ist: Ein kleiner Teil der Vesikel (ca. 5 %) fluoreszierte nach Behandlung mit Antiserum gegen $P_{408-417}$ und einem mit Fluorescein markierten zweiten Antikörper.

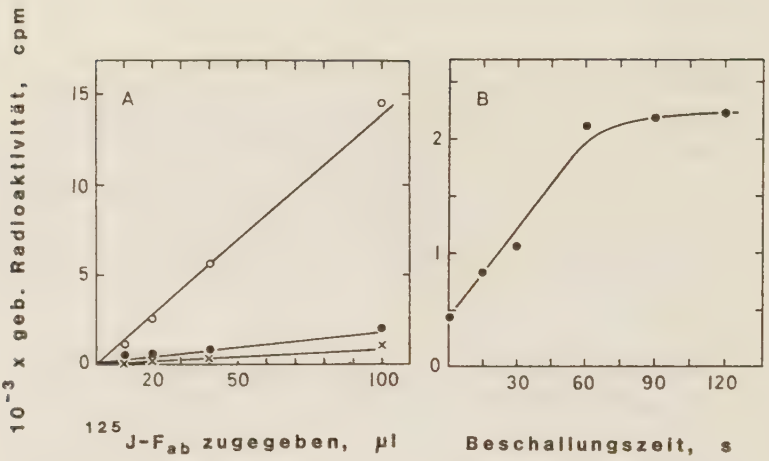


Abb.12 : Bindung von ^{125}J-Anti-C-Terminus-IgG an invertierte und nativ orientierte Membranvesikel

E.coli-Membranvesikel mit nativer Orientierung wurden nach der Methode von Kaback (92) aus Stamm ML308-225 präpariert und durch kurzes Beschallen in Vesikel mit invertierter Orientierung umgewandelt.

A) An frisch präparierte native (● - ●) und invertierte (o - o) Vesikel (10,2 µg Membranprotein, 60 s Beschallungszeit) gebundene Radioaktivität nach Inkubation mit ^{125}J-markiertem peptidspezifischem F_{ab} (650 cpm/µl) und Sedimentation der Vesikel durch Ultrazentrifugation. x - x , unspezifische Bindung an die Zentrifugenröhrchen.

B) Gebundene Radioaktivität an unterschiedlich lang beschallte Vesikel (14,8 µg Membranprotein, Inkubation mit 10 000 cpm ^{125}J-F_{ab}).

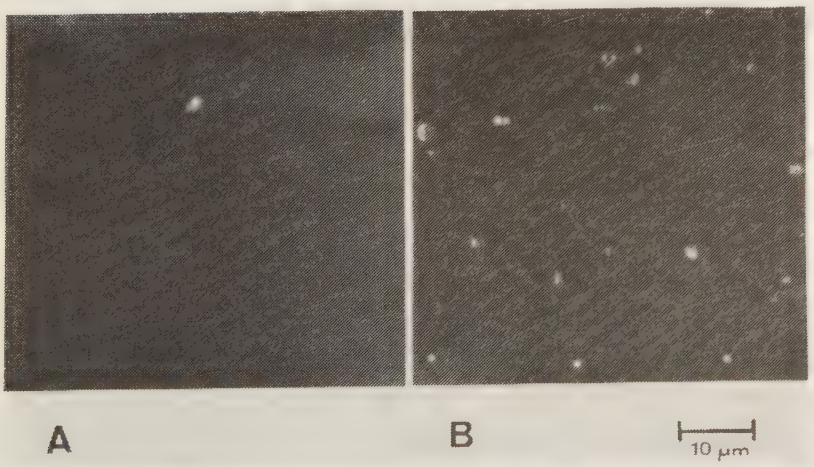
Abb.13 : Reaktion von Anti-C-Terminus-Antikörpern mit Membranvesikeln von ML308-225 →

A) Immunfluoreszenzaufnahme von Memoranvesikeln, die durch osmotische Lyse aus Sphäroblasten von ML308-225 präpariert wurden (92), nach Inkubation mit Antiserum gegen $P_{408-417}$ und mit fluoresceinmarkierten Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern.

B) Gegenfärbung aller Vesikel mit Rhodaminisothiocyanat.

3.3.1.4 Einfluß der Anti-C-Terminus-Antikörper auf Substratbindung und Transport

Die Antikörper gegen den synthetischen C-Terminus zeigten keine Hemmung der Bindung oder des Transports von Galactosiden durch den Lactose:H^+-Carrier (Abb.14). Die durch Flußdialyse gemessene Bindung von NpαGal durch den Carrier war in Membranen, die mit Antiserum inkubiert waren (● - ● in Abb.14, A), um etwa 10 % höher als in der mit Präimmunserum behandelten Kontrolle (o - o). Wie Abb. 14, B zeigt, unterschieden sich GalSGal-Melibiose-Gegentransport in Gegenwart von Antiserum (● - ●) und Präimmunserum (o - o) weder in Anfangsgeschwindigkeit (ca. 0,4 nmol/min•mg Protein), noch im Ausmaß der Akkumulation (ca. 11-fach) oder in der Halbwertszeit des Effluxes (ca. 20 s).



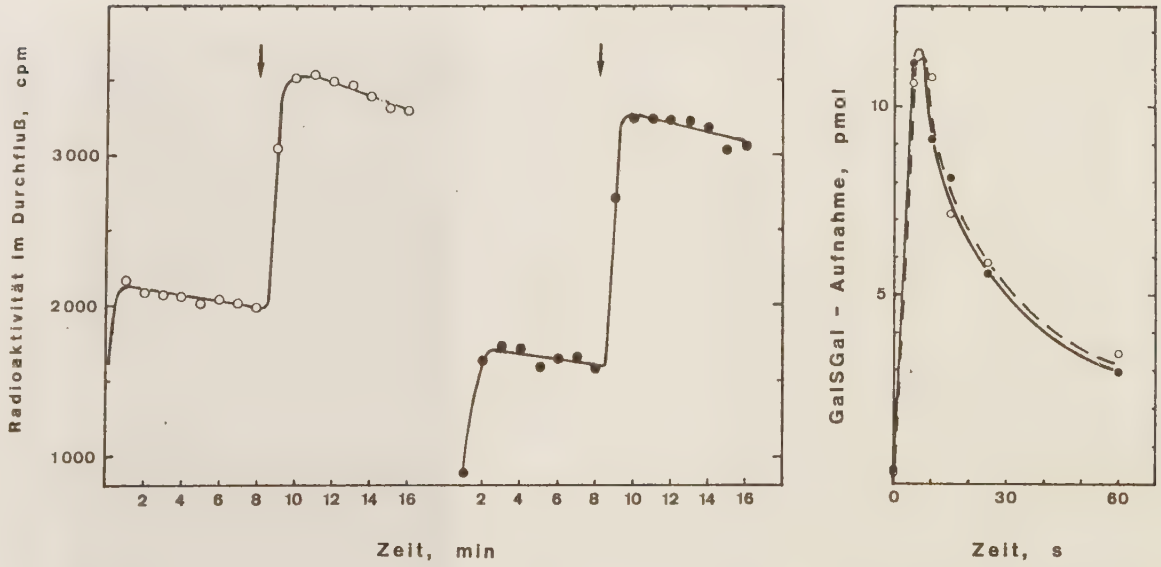


Abb.14 : Einfluß von Anti-C-Terminus-Antikörpern auf die Aktivität des Lactose:H^+-Carriers

A) Bindung von NpαGal an cytoplasmatische Membranen von *E.coli* T206, gemessen durch Flußdialyse (11), nach Inkubation der Membranen mit Antiserum gegen $P_{408-417}$ (● - ●) oder Kaninchen-Normalserum (o - o); ↓, Zugabe von 10 µl 20 mM *p*-Hydroxymercuribenzolsulfonat.

B) GalSGal-Melibiose-Gegentransport in invertierten Membranvesikeln von Stamm ML308-225. Mit 15 mM Melibiose beladene Vesikel wurden mit Antiserum (●—●) bzw. Präimmunserum (o---o) versetzt und 1:30 in 1 x 10^{-6}M [^{3}H]GalSGal verdünnt.

3.3.2. Antikörper gegen $P_{125-135}$

3.3.2.1. Reaktivität mit dem Lactose:H^+-Carrier in Immunoblot und Immunpräzipitation

Die Reaktion von Antiserum gegen $P_{125-135}$ (an KLH mit Glutaraldehyd gekoppelt) mit Membranproteinen des Carrier-Überproduzenten T206 im Immunoblot (Abb.15, Spur 1) war nicht von der unspezifischen Bindung an Proteine aus Membranen, die keinen Carrier enthielten (Spur 2) zu unterscheiden. Dagegen zeigten, über $P_{125-135}$-CH-Sepharose aus diesem Serum affinitätsgereinigte Antikörper eine spezifische Reaktion mit der für den Carrier typischen, breiten Proteinbande bei M_r = 33 000 (Abb.15, Spur 3, 4).

Abb.15 : Reaktion von Antikörpern gegen $P_{125-135}$ mit dem Carrier im Immunoblot

Proteine der Cytoplasmamembran von des Carrier-Überproduzenten T206 (Spur 1, 4) und von T184 (kein Carrier, Spur 2, 3) wurden elektrophoretisch getrennt, auf Nitrocellulose übertragen und mit Antiserum gegen $P_{125-135}$ (1:100, Spur 1, 2) oder affinitätsgereinigtem Anti-$P_{125-135}$-IgG (3,5 µg/ml, Spur 3, 4) über Nacht bei 4°C inkubiert, gefolgt von enzymmarkierten zweiter Antikörpern sowie einem chromogenen Substrat (Spur 1, 2: 75 µg Membranprotein, Peroxidase-Anti-Kaninchen-IgG 1:500; Spur 3, 4: 50 µg Membranprotein, Phosphatase-Anti-Kaninchen-IgG 1:1000).

Von T.Möröy (101) wurde mit dem unfraktionierten Antiserum gegen $P_{125-135}$ eine Immunpräzipitation des in einem zellfreien Transkriptions-Translations-System *in vitro* synthetisierten Lactose:H^+-Carriers gefunden, während keine Präzipitation des aus *E.coli*-Membranen solubilisierten Carriers beobachtet werden konnte. Dies könnte auf einer unterschiedlichen Empfindlichkeit der beiden Immunpräzipitationstest — bedingt durch eine höhere spezifische Radioaktivität des *in vitro* synthetisierten Carriers — beruhen, oder darauf, daß die Anti-$P_{125-135}$-Antikörper zwischen dem *in vitro* synthetisierten, möglicherweise nicht ganz korrekt gefalteten Carrier und dem aus *E.coli*-Membranen solubilisierten Protein unterscheiden können. Im letzteren Fall könnten die Anti-$P_{125-135}$-Antikörper ein wichtiges Reagens für die Faltung des Carriers darstellen.

Deshalb wurde ein Immunpräzipitationstest mit dem affinitätschromatographisch gereinigten Anti-$P_{125-135}$-IgG durchgeführt und mit einer gleichzeitig vorgenommenen Immunpräzipitation durch das Anti-$P_{408-417}$-Serum verglichen. Um dabei den aus *E.coli*-Membranen solubilisierten Carrier mit mindestens ebenso hoher spezifischer Radioaktivität einzusetzen wie das im zellfreien System synthetisierte Protein, wurde die spezifische Radioaktivität des [^{35}S]Methionins bei der biosynthetischen Markierung gegenüber den in Abschn.2.2.6.1. beschriebenen Bedingungen erhöht, so daß für beide Produkte etwa 10^4 cpm/pmol Carrier erreicht wurden.

Wie Abb.16 zeigt, konnte eine spezifische Präzipitation des aus Membranen solubilisierten Carriers durch das Anti-$P_{125-135}$-IgG nicht nachgewiesen werden. Die präzipitierte Radioaktivität (~2500 cpm) verteilte sich bei der Gelektrophorese über den gesamten Molekulargewichtsbereich (Spur 3), während die parallel dazu mit dem Anti-$P_{408-417}$-Serum präzipitierte Radioaktivität (~4000 cpm) in der für den Carrier charakteristischen Bande bei M_r = 33 000 konzentriert war (Spur 2).

Abb.16 : Immunpräzipitation mit Anti-$P_{125-135}$-IgG *

Indirekte Immunpräzipitation aus detergenssolubilisierten ^{35}S-Rohmembranen von Stamm T206 (Spur 1-3) bzw. von in einem zellfreien Transkriptions-Translations-System (102) mit Plasmid pGM21 als Matrize in Gegenwart von Detergens synthetisiertem Lactose:H^+-Carrier (Spur 4-6).

Solubilisierte Membranen und zellfrei synthetisierter Carrier wurden jeweils in Immunpräzipitationspuffer (s.Abschn.2.2.5.3.) verdünnt, 30 min bei 100 000 x g zentrifugiert und jeweils 500 µl der mit Staphylococcen vorabsorbierten Überstände zur Immunpräzipitation eingesetzt (je ca. 1 pmol Carrier/Probe, ca. 10^4 cpm/pmol Carrier). Abweichend von Abschn.2.2.5.3. wurden alle Inkubationen bei 0-4°C durchgeführt. Die Detergenskonzentrationen in beiden Ultrazentrifugationsüberständen lagen bei 0,2 mg/ml Dodecylmaltosid und 1,5 mg/ml Lubrol PX.

Spur 1, 4 : 5 µl Präimmunserum
Spur 2, 5 : 1 µl Anti-$P_{408-417}$-Serum
Spur 3, 6 : 45 µg peptidspezifisches Anti-$P_{125-135}$-IgG

* Das Experiment wurde zusammen mit U.Stochaj durchgeführt, die auch den zellfrei synthetisierten Carrier zur Verfügung stellte.

Aus dem zellfrei synthetisierten Material präzipitierte das Anti-$P_{125-135}$-IgG ~2000 cpm und diese Radioaktivität lief im SDS-Polyacrylamidgel mit dem für den Carrier charakteristischen Molekulargewicht (Abb.16, Spur 6). Das Anti-C-Terminus-Serum präzipitierte unter diesen Bedingungen nur etwa 1500 cpm und damit nur 1/5 des eingesetzten zellfrei synthetisierten Carriers, was möglicherweise durch eine Abspaltung des sehr proteolyseempfindlichen C-Terminus durch im *in vitro*-Syntheseansatz vorhandene Proteasen zu erklären ist.

Die Ergebnisse der Immunpräzipitation sprechen für eine unterschiedliche Reaktivität der Anti-$P_{125-135}$-Antikörper gegenüber dem im zellfreien System synthetisierten und dem aus *E.coli*-Membranen solubilisierten Lactose:H^+-Carrier.

3.3.2.2. Reaktivität mit dem membrangebundenen Carrier

Für $P_{125-135}$ spezifisches IgG wurde mit ^{125}J markiert (vergl.3.3.1.3.). Mehr als 85 % der nach der Jodierung von der Peptid-Sepharose eluierten Radioaktivität zeigten spezifische Bindung an immobilisiertes $P_{125-135}$, nicht jedoch an immobilisiertes $P_{408-417}$, das als Kontrolle eingesetzt wurde. Im Immunoblot (Abb.17) reagierte das ^{125}J-Anti-$P_{125-135}$- IgG mit dem Lactose:H^+-Carrier, jedoch betrug unter den Versuchsbedingungen die spezifische Bindung an die Bande bei M_r = 33 000 nur etwa 0,1 % der eingesetzten Radioaktivität.

Durch osmotische Lyse wurden aus Sphäroblasten der Stämme T206 (*lacY*$^+$) und T184 (*lacY*$^-$) Membranvesikel mit überwiegend nativer Orientierung hergestellt (vergl.Abschn. 3.3.1.3.). Konstante Mengen dieser Vesikel und von beschallten, invertierten Vesikeln (10 µg Membranprotein) wurden mit steigenden Mengen radioaktiver Anti-$P_{125-135}$-Antikörper (2 800 - 140 000 cpm) für 12 h bei 4°C inkubiert und nach Zugabe von Protaminsulfat bei 10 000 x g sedimentiert.

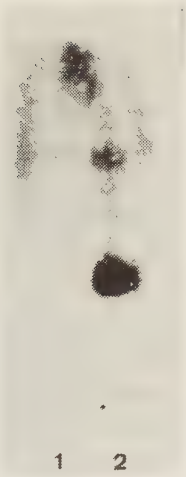


Abb.17 : Immunoblot mit ^{125}J-markierten Antikörpern gegen $P_{125-135}$

Cytoplasmamembranproteine (50 µg) von Stamm T184 (Spur 1) und T206 (Spur 2), nach Gelelektrophorese auf Nitrocellulose übertragen, wurden mit ^{125}J-markiertem Anti-$P_{125-135}$-IgG (1,5 x 10^6 cpm in 4 ml) 16 h bei 4°C inkubiert. Der Nitrocellulosefilter wurde 2 x 30 min gewaschen, getrocknet und autoradiographiert.

Die in den Präzipitaten gebundene Radioaktivität stieg linear mit der eingesetzten Antikörpermenge und betrug, unabhängig von der Orientierung, für die Vesikel beider Stämme 3,3 ± 0,1 % der eingesetzten Radioaktivität. Eine spezifische Bindung an den membrangebundenen Carrier konnte also in keiner der beiden Orientierungen des Carriers beobachtet werden.

Damit stimmt überein, daß nach Inkubation von gereinigtem Anti-$P_{125-135}$-IgG mit cytoplasmatischen Membranen aus Stamm T206 keine Verringerung des im ELISA gegen das freie Peptid gemessenen Antikörpertiters festzustellen war.

3.3.2.3. Lokalisierung des Peptids (125-135) des Lactose: H^+-Carriers in der Cytoplasmamembran

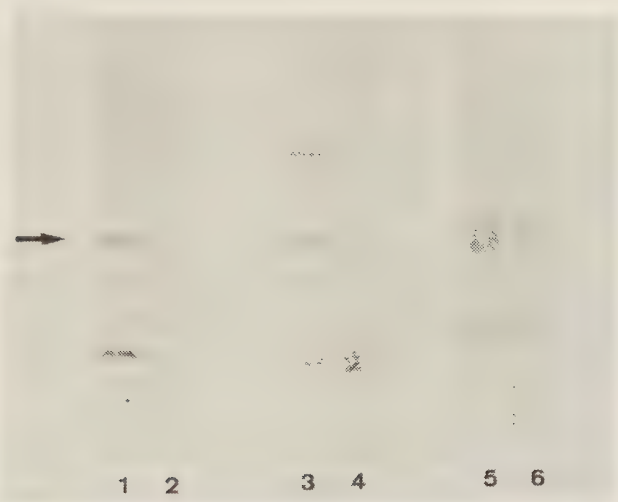
Durch Spaltung mit verschiedenen Proteasen entsteht aus dem Lactose:H^+-Carrier ein Fragment, das bei der SDS-Gelelektrophorese in einem 11 % - Acrylamidgel mit einem scheinbaren Molekulargewicht von M_r = 22 000 läuft (103, J.K.Wright, unveröffentlichte Beobachtung, R.Ehring, per-

sönliche Mitteilung). Dieses Fragment enthält das MalNEt-modifizierbare Cys_{148} (J.K.Wright, unveröffentl.B.) und reagiert mit den Anti-C-Terminus-Antikörpern (s.Abb.7). Außerdem wurden N-terminal vor Cys_{148} in der Sequenz des Carriers mehrere Thermolysin-Spaltstellen lokalisiert (B. Bieseler, pers. Mitteilung).

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde versucht, den membrangebundenen Lactose:H^+-Carrier im Bereich von Aminosäure 125-135 proteolytisch zu spalten, um so das Epitop zu zerstören, das von den Antikörpern gegen $P_{125-135}$ im Immunoblot erkannt wird, und so auf indirekte Weise zu bestimmen, auf welcher Seite der Membran dieser Abschnitt des Carriers lokalisiert ist.

Wie Abb.18 zeigt, wurde das von Anti-$P_{125-135}$-Antikörpern erkannte Epitop auf dem Lactose:H^+-Carrier tatsächlich durch Behandlung mit Thermolysin zerstört: Die im Immunoblot von beschallten (invertierten) Membranvesikeln deutlich sichtbare Carrierbande (Spur 1) war nach Thermolysin-Behandlung der Vesikel nicht mehr zu erkennen (Spur 2), ohne daß ein neues, mit Anti-$P_{125-135}$-IgG reagierendes Fragment auftauchte. Dagegen blieb eine Reaktion des Anti-$P_{125-135}$-IgG mit der Carrierbande im Immunoblot erhalten, wenn Membranvesikel mit Thermolysin behandelt wurden, die durch osmotische Lyse präpariert und nicht beschallt worden waren, also überwiegend native Orientierung aufwiesen (vergl.Abschn.3.3.1.3.).

Das von Anti-$P_{125-135}$-IgG erkannte Epitop verhielt sich damit ebenso, wie der auf der cytoplasmatischen Seite der Membran lokalisierte C-Terminus, der ebenfalls von Thermolysin abgespalten wird (Abb.18, vergl. Spur 3, 4 mit Spur 5, 6).



	1	2	3	4	5	6
Beschallung	+	+	-	+	-	+
Protease	-	+	+	+	+	+
Antikörper gegen	$P_{125-135}$		$P_{125-135}$		$P_{408-417}$	
Stamm	T206		T4UW		T4UW	

Abb.18 : Immunoblots von carrierhaltigen Membranvesikeln nach Thermolysin-Behandlung

Membranvesikel wurden aus Carrierüberproduzenten (Stamm T206 in Spur 1, 2; Stamm T4UW in Spur 3-6) durch osmotische Lyse präpariert (überwiegend native Orientierung) und ein Teil der Vesikel durch Beschallen in invertierte Vesikel umgewandelt (Spur 1, 2, 4, 6; Spur 3, 5: nicht beschallte Vesikel). Nach Inkubation mit Thermolysin (Spur 3-6: 60 min bei 32°C; Spur 2: 90 min bei 37°C; Spur 1: sofort gestoppt) und stoppen der Protease-Reaktion wurden Immunoblots (50 µg Membranprotein/Spur) mit Antikörpern gegen $P_{125-135}$ (Spur 1-4; 2 - 3 µg IgG/ml) bzw. $P_{408-417}$ (Antiserum; 1:1000) durchgeführt (2.Antikörper: Phosphatase-anti-Kaninchen-IgG).

3.3.3. Antikörper gegen P_{1-9}, $P_{130-140}$ und $P_{132-144}$

Aus den Antiseren gegen die verschiedenen immunogenen Konjugate der Peptide P_{1-9}, $P_{130-140}$ und $P_{132-144}$ wurden die peptidspezifischen Antikörper durch Affinitätschromatographie gereinigt und auf ihre Reaktivität mit dem Lactose:H^+-Carrier im Immunoblot untersucht. Nur die Antikörper gegen $P_{130-140}$ zeigten eine schwache Reaktion mit dem Carrier (Abb.19), während Antikörper gegen den N-Terminus sowie gegen $P_{132-144}$ nicht erkennbar mit dem Protein reagierten.

Abb.19 : Immunoblot mit Anti-$P_{130-140}$-IgG

Auf Nitrocellulose transferierte Cytoplasmamembranproteine (50 µg) von Stamm T206 (Spur 1, 3) und T184 (Spur 2, kein Carrier) wurden mit Anti-$P_{130-140}$-IgG (2 µg/ml, Spur 1, 2) über Nacht bei 4°C bzw. Anti-C-Terminus-Serum (1:1000, Spur 3) 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und das gebundene IgG mit einem enzymmarkierten 2. Antikörper sichtbar gemacht.

3.4. Antikörper gegen den synthetischen C-Terminus als Reagentien zur Charakterisierung und Quantifizierung des Lactose:H^+-Carriers

3.4.1. Orientierung des Carriers in Membranen und rekonstituierten Proteoliposomen

Für das Verständnis der Funktionsweise des Lactose:H^+-Carriers ist es von zentraler Bedeutung, die Orientierung des Proteins in verschieden präparierten Membranvesikeln und rekonstituierten Proteoliposomen zu kennen, die für Substratbindungs- und Transportmessungen sowie proteinchemische und physikalisch-chemische Untersuchungen verwendet werden. Deshalb wurden zwei Methoden entwickelt, mit deren Hilfe die Topologie von carrierhaltigen Membranvesikeln und die Orientierung des rekonstituierten Proteins bestimmt werden konnte (94). Beide Methoden basieren auf der Spezifität der Antikörper gegen den synthetischen C-Terminus des Carriers ($P_{408-417}$).

Methode I nutzt die Möglichkeit aus, das Epitop, das von den peptidspezifischen Antikörpern auf dem Lactose:H^+-Carrier erkannt wird, durch Behandlung mit Carboxypeptidase zu entfernen (vergl.Abschn.3.3.1.2, Abb.10). Membranvesikel und rekonstituierte Proteoliposomen wurden mit Carboxypeptidase A (CPA) inkubiert und dadurch die auf der Außenseite der Vesikel exponierten C-Termini entfernt. Nach Stoppen der Reaktion wurden die Vesikel mit LiDS aufgelöst, die Proteine elektrophoretisch getrennt und auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. Die übriggebliebenen, also für CPA unzugänglichen C-Termini wurden durch Reaktion mit radioaktiv markierten Antikörpern bestimmt. Die quantitative Auswertung dieser Methode wurde in (94) beschrieben, Abb.20 und Tab.8 stellen die Ergebnisse für einige der untersuchten Membranvesikel- und Proteoliposomenpräparationen dar. Behandlung von T206-Sphäroblasten mit CPA reduzierte die Antikörperbindung nicht (Abb.20, Spur 1, 2), während in French-Press-Vesikeln aus T206

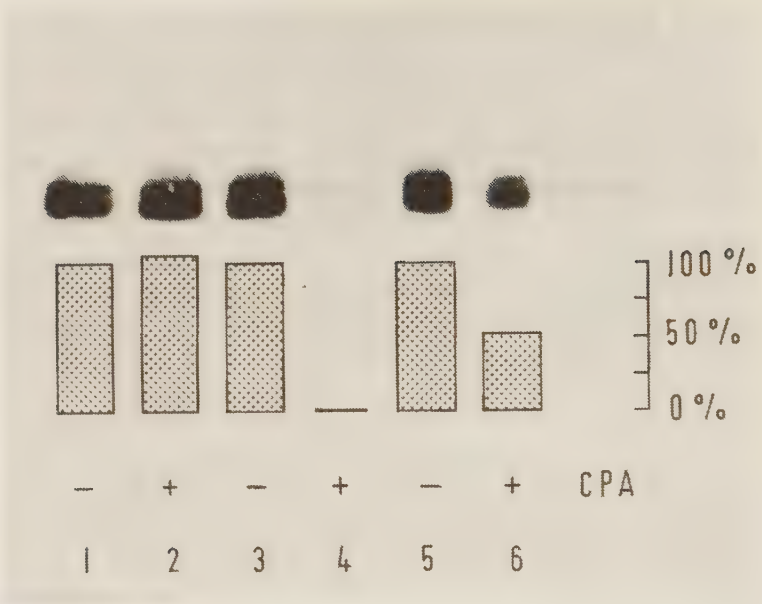


Abb.20 : Zugänglichkeit des C-Terminus des Lactose:H^+-Carriers in Sphäroblasten (Spur 1, 2), French-Press-Vesikeln (Spur 3, 4) und rekonstituierten Proteoliposomen (Spur 5, 6)

Die nach Behandlung mit Carboxypeptidase A (CPA) verbliebenen C-Termini wurden im Immunoblot nach Reaktion mit ^{125}J-Anti-C-Terminus-IgG durch Peroxidase-Anti-Kaninchen-IgG sichtbar gemacht (oben), die einzelnen Spuren des Nitrocellulosefilters ausgeschnitten und die gebundene Radioaktivität im Gammazähler bestimmt (senkrechte Balken).

mehr als 95 % der C-Termini für die Exopeptidase zugänglich waren (Spur 3, 4). Dieses Ergebnis bestätigte die Lokalisierung des C-Terminus auf der inneren Oberfläche der Cytoplasmamembran (s.Abschn.3.3.1.3.) und ermöglichte die Verwendung der invertierten Vesikel, die in der French-Press durch Zellaufschluß unter hohem Druck hergestellt werden,

zur Standardisierung in Methode II (s.unten).

Durch CPA-Behandlung von rekonstituierten carrierhaltigen Proteoliposomen (10) sank die Bindung von ^{125}J-Anti-C-Terminus-IgG auf etwa die Hälfte des Wertes für die unbehandelten Proben (Abb.20, Spur 5, 6). Nur etwa 50 % der C-Termini der rekonstituierten Carriermoleküle waren also für die Exopeptidase zugänglich. Elektronenmikroskopische Aufnahmen solcher Proteoliposomenpräparationen zeigten ausschließlich kleine, einschalige Vesikel (vergl.(10)), so daß die Unzugänglichkeit von etwa der Hälfte der C-Termini darauf hindeutet, daß der Carrier bei der Rekonstitution in beiden möglichen Orientierungen in die Proteoliposomen eingebaut wird. In diesem Fall sollten, bei gleichem Carriergehalt, rekonstituierte Proteoliposomen nur halb so viel Anti-C-Terminus-IgG binden können wie French-Press-Vesikel, in denen alle C-Termini von außen zugänglich sind.

Die direkte Bindung von ^{125}J-markiertem Anti-C-Terminus-IgG an Membranvesikel und Proteoliposomen mit bekanntem Carriergehalt wurde in Methode II verglichen. Zur Standardisierung wurden dabei French-Press-Vesikel von Stamm T206 verwendet, deren Carriergehalt über die Bindung von NpαGal bestimmt worden war. Konstante Mengen dieser Vesikel und von rekonstituierten Proteoliposomen wurden mit steigenden Mengen von ^{125}J-Anti-C-Terminus-IgG für mehrere Stunden inkubiert, durch Zugabe von Protaminsulfat aggregiert und durch Zentrifugation bei 10 000 x g zusammen mit den gebundenen Antikörpern sedimentiert. Die Radioaktivität in den Präzipitaten zeigte dabei ein Sättigungsverhalten (Abb.21, A, B). Sie wurde durch Behandlung der Vesikel mit Carboxypeptidase auf das Niveau der unspezifischen Bindung in Abwesenheit von carrierhaltigen Vesikeln gesenkt (Abb.21, ▲—▲). Vesikel des Kontrollstammes T184, die in bis zu 100 fachem Überschuß zugesetzt wurden, um die Aggregation durch Protaminsulfat zu erleichtern, zeigten keinen Einfluß auf die Antikörperbindung. Nach Abzug der unspezifischen Bindung wurden hyperbole Bindungskuven er-

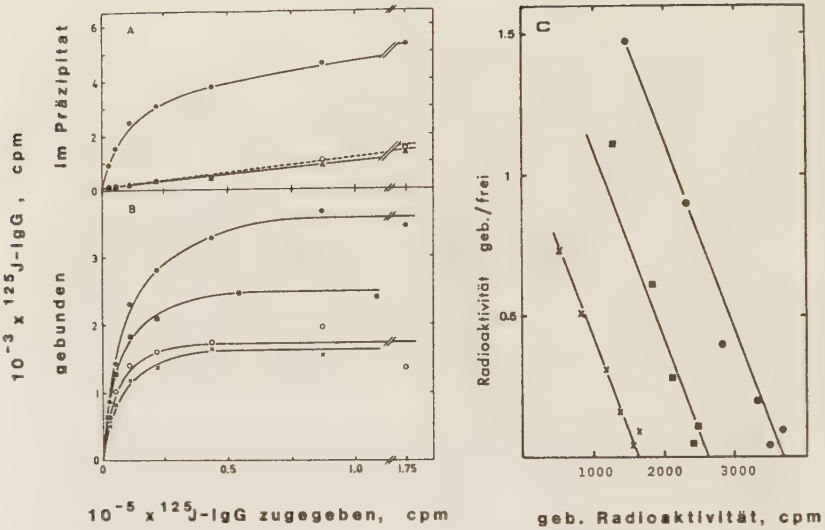


Abb.21 : Bindung von ^{125}J-Anti-C-Terminus-IgG an Membranvesikel und rekonstituierte Proteoliposomen

A) Durch Zellaufschluß in der French-Press hergestellte, invertierte Membranvesikel von Stamm T206 (●—● , 104 fmol Lactose:H^+-Carrier, 0,1 µg Protein) und ein etwa 50facher Überschuß von Vesikeln aus T184 (kein Carrier, 5 µg Protein) wurden mit steigenden Mengen ^{125}J-Anti-C-Terminus-IgG für 3 h bei 37°C inkubiert, durch Zugabe von Protamin aggregiert und die Radioaktivität im Präzipitat nach Zentrifugation bestimmt. ▲—▲ , T206-Vesikel, mit Carboxypeptidase behandelt; O----O , nur T184-Vesikel.

B) Hyperbole Bindungskurven nach Abzug der unspezifischen Bindung (O----O , ▲——▲ in A) für 104 fmol (●—● , vergl A) und 52 fmol (O—O) Carrier in French-Press-Vesikeln, sowie 120 fmol (■——■) und 113 fmol (✕——✕) rekonstituierten Carrier in Proteoliposomen nach (10) bzw. (21).

C) Symbole wie in B, Linearisierung nach Scatchard (104).

halten (Abb.21, B), die nach Scatchard (104) linearisiert wurden (Abb.21, C), um die bei Sättigung gebundene Radioaktivität zu bestimmen. Diese stieg linear mit dem Carrier-

gehalt der Proben und betrug für die French-Press-Vesikel 38 ± 10 cpm/fmol Carrier.

Proteoliposomen, die den rekonstituierten oder gereinigten und rekonstituierten Lactose:H^+-Carrier enthielten, banden, unabhängig von der Rekonstitutionsmethode, erheblich weniger radioaktives Anti-C-Terminus-IgG als French-Press-Vesikel gleichen Carriergehalts (Abb.21, B). Die in der Sättigung gebundene Radioaktivität war unabhängig vom Protein/Lipid-Verhältnis und betrug bei Proteoliposomen, die nach Solubilisierung durch Dodecylmaltosid unter Extraktion des Detergens in eine hydrophobe Polystyrolmatrix hergestellt waren (10), 20 ± 2 und 23 ± 2 cpm/fmol rekonstituierten bzw. gereinigten und rekonstituierten Carrier. Nach Solubilisierung oder Solubilisierung und Reinigung des Carriers in Octylglucosid + Lipid durch Verdünnen hergestellte Proteoliposomen (21-23) banden 19 ± 4 cpm/fmol Carrier.

Die mit den beiden komplementären Methoden gemessenen Werte (Methode II mißt externe, Methode I im Innern der Vesikel unzugängliche C-Termini) stimmen damit sehr gut überein. Sie sind in Tab.8 zusammengefaßt und zeigen, daß der Lactose:H^+-Carrier bei der Rekonstitution in Proteoliposomen in beiden möglichen Orientierungen etwa im Verhältnis 1 : 1 eingebaut wird.

3.4.2. Quantifizierung des Lactose:H^+-Carriers

3.4.2.1. Quantitative Immunpräzipitation

Durch das Antiserum gegen den synthetischen C-Terminus ($P_{408-417}$) wurden 16 ± 1 % der Radioaktivität aus [^{35}S]Methionin-markierten Rohmembranen des Carrier-Überproduzenten T206 präzipitiert. In der Fluorographie des gelelektrophoretisch aufgetrennten Präzipitats war nur die charakteristische Bande des Carriers bei M_r = 33 000 erkennbar. Eine Ursache dieses hohen Anteils des ^{35}S-markierten Lactose:H^+-Carriers an der Radioaktivität des (nach

Tabelle 8 : Zugänglichkeit des C-Terminus in Sphäroblasten, invertierten Vesikeln und rekonstituierten Proteoliposomen

Probe	Lipid:Protein (g/g)	% C-Terminus zugänglich* für CPA (Methode I)	Antikörper (Methode II)
French-Press-Vesikel aus T206	--	96 ± 1	100 ± 26
Vesikel aus beschallten T206 - Zellen	--	96 ± 1	--
Sphäroblasten von T206	--	- 2 ± 3	--
Rekonstituiert (10) aus Dodecylmaltosid	1,8	56	55
	10,8	52	53
Gereinigt, rekonstituiert aus Dodecylmaltosid (24)	15,8	53	60
	48	58	63
Rekonstituiert (2') aus Octylglucosid	--	52	39
Gereinigt, rekonstituiert aus Octylglucosid (22)	--	56	59

* Für Methode I berechnet aus der Differenz der Bindung von Anti-C-Terminus-IgG an unbehandelte und CPA-behandelte Probe im Immunoblot

Für Methode II aus Verhältnis der Bindung von Anti-C-Terminus-IgG an die Vesikel zur Anzahl der Substratbindungsstellen

Induktion durch IPTG) neu synthetisierten Membranproteins ist der Leit überdurchschnittliche Methioningehalt des Carriers von 3,4 mol%.

Unter gleichen Bedingungen konnten aus solubilisierten Rohmembranen von T206-Zellen, die in Gegenwart eines

[^{14}C]Aminosäuregemischs gewachsen waren, 6,2 ± 0,3 % der Radioaktivität präzipitiert werden. Bei Annahme einer gleichmäßigen Markierung aller Membranproteine durch das [^{14}C]Aminosäuregemisch entspricht dies einem Carriergehalt von 1,33 ± 0,06 nmol/mg neu synthetisiertem Protein, bzw. 1,03 ± 0,05 nmol/mg Gesamtprotein. Eine parallel dazu durchgeführte Messung der NpαGal-Bindung in der Flußdialyse ergab 1,1 ± 0,05 nmol Bindungsstellen / mg Membranprotein.

3.4.2.2. Bindung von markiertem Anti-C-Terminus-IgG an invertierte *E.coli*-Membranvesikel

Die Bindung von ^{125}J-markierten Antikörpern gegen $P_{408-417}$ an invertierte Membranvesikel stellt ein sehr empfindliches Maß für ihren Gehalt an Lactose:H^+-Carrier dar. Bereits 50 fmol Carrier konnten mit einer Genauigkeit von ± 30 % bestimmt werden (Methode II in Abschn.3.4.1.).

Auch mit Hilfe von peroxidase-konjugiertem Anti-C-Terminus-IgG, das gegenüber den radioaktiv markierten Antikörpern den Vorteil der längeren Haltbarkeit besitzt, konnte der Carrierspiegel in solchen Vesikeln bestimmt werden (Abb.22), jedoch zeigte das Peroxidase-Konjugat eine wesentlich höhere unspezifische Bindung an die Vesikel als das ^{125}J-Anti-C-Terminus-IgG.

3.4.2.3. Bestimmung des Carrierspiegels im Immunoblot und Charakterisierung einer *lacY*-Mutante

Die quantitative Bestimmung des auf Nitrocellulose transferierten Lactose:H^+-Carriers mit Hilfe von ^{125}J-markierten peptidpezifischen Antikörpern wurde zur Bestimmung der Orientierung des Carriers verwendet (Methode I in Abschn.3.4.1.; vergl.(94)). Unter Vermeidung der aufwendigen Jodierung und Reinigung der peptidspezifischen Antikörper konnte der Carriergehalt verschiedener Membranpräparationen auch mit Hilfe eines enzymmarkierten zweiten

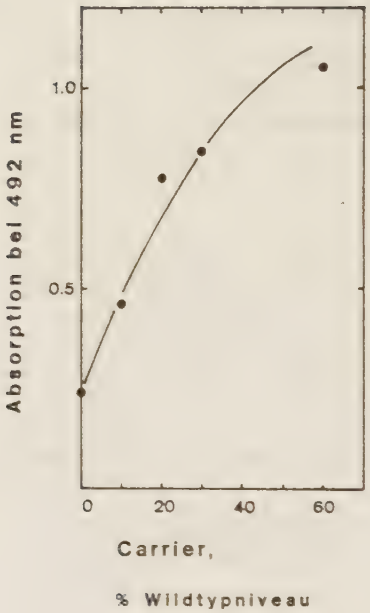


Abb.22 : Bestimmung des Carrierspiegels mit Peroxidase-Anti-C-Terminus-IgG

Rohmembranvesikel aus induzierten und nicht induzierten *E.coli*-Wildtypzellen wurden in unterschiedlichen Anteilen gemischt und mit peroxidase-markierten Antikörpern gegen $P_{408-417}$ inkubiert, zentrifugiert und die gebundene Enzymaktivität bestimmt.

Antikörpers im Immunoblot bestimmt werden. Dazu wurden verschiedene Mengen von Membranen mit bekanntem Carriergehalt als Standards sowie Membranen mit unbekanntem Carriergehalt mit LiDS solubilisiert, die Proteine im Acrylamidgel getrennt und elektrophoretisch auf einen Nitrocellulosefilter übertragen. Nach Inkubation mit Anti-$P_{408-417}$-Serum, gefolgt von Phosphatase-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörpern wurden die Carrierbanden bei M_r = 33 000 durch kurze Behandlung mit einem bei Umsatz präzipitierenden Substrat sichtbar gemacht, ausgeschnitten, und die Enzymaktivität auf den Filterstückchen mit *p*-Nitrophenylphosphat als löslichem Substrat bestimmt. Diese Methode erwies sich als be-

sonders wertvoll zur Bestimmung des Carriergehalts von Membranen aus *E.coli*-Mutanten, in denen der Lactose:H^+-Carrier wegen seiner veränderten kinetischen Eigenschaften oder wegen geringer Expression des *lacY*-Gens nicht durch Substratbindung quantifiziert werden kann.

Ein Beispiel für den Vergleich einer solchen Mutante mit dem isogenen Wildtypstamm ist in Abbildung 23 dargestellt. Die *E.coli* K12-Mutante X71-54 wurde im Labor von

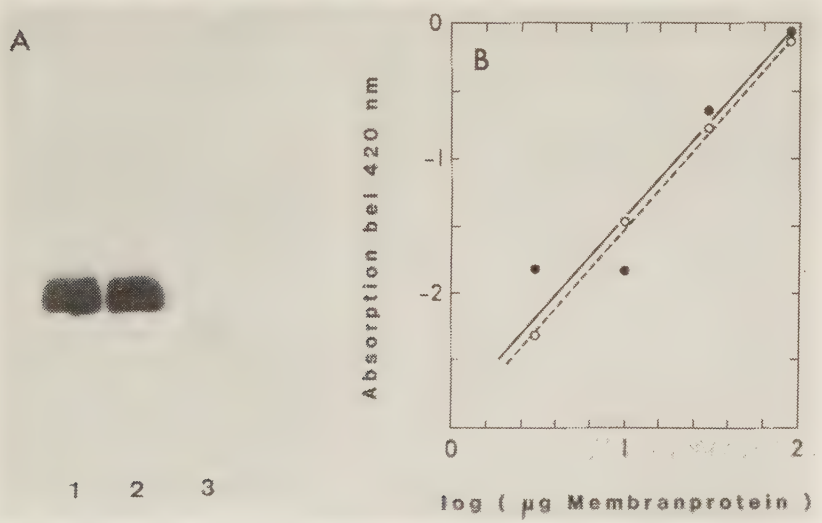


Abb.23 : Reaktion des Carriers aus Mutante (X71-54) und Wildtyp mit Anti-C-Terminus-Serum im Immunoblot

A) Immunoblot von Rohmembranen (100 µg Protein) aus beschallten Zellen von *E.coli* X71-54 (Spur 1), X71 (Spur 2) und K131 (Spur 3, kein Carrier).

B) Vergleich der Carrierkonzentration in Membranen von Mutante (X71-54, o---o) und Wildtyp (X71, ●——●) durch quantitative Auswertung von Immunoblots. Die durch ein präzipitierendes Substrat sichtbar gemachten Carrierbanden wurden ausgeschnitten und die Filterstückchen (ca. 1x1cm) in 2 ml 0,5 mg/ml *p*-Nitrophenylphosphat, 50 mM $NaHCO_3$, 2 mM $MgSO_4$, pH 9,5 für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von je 50 µl 5 M NaOH und 0,5 M NaEDTA gestoppt und die Absorption bei 420 nm gemessen.

Wilson isoliert und zeigt einen scheinbar energie-entkoppelten Phänotyp (105-107,137), der auf einer - für verschiedene Substrate unterschiedlichen - Veränderung der Translokationsraten des beladenen und unbeladenen Carriers beruht (112). Die Mutation in X71-54 wurde von Hobson et al. (108) kartiert, die fanden, daß die Mutation am C-terminalen Ende des Proteins (in Deletionsgruppe XXXVI des *lacY*-Gens) liegt oder eine Deletion zwischen *lacY*- und *lacA*-Gen darstellt. Der qualitative Vergleich der Lactose:H^+-Carrier aus X71-54 und dem Wildtypstamm X71 im Immunoblot (Abb.23A) zeigte keinen Unterschied in der Reaktivität mit dem Antiserum gegen den chemisch synthetisierten Wildtyp-C-Terminus und im apparenten Molekulargewicht. Die Mutation in X71-54 kann also keine Deletion zwischen *lacY*- und *lacA*-Gen darstellen und betrifft nicht den extremen C-Terminus des Lactose:H^+-Carriers. Die quantitative Auswertung des Immunoblots (Abb.23B) ergab für Mutanten- und Wildtypmembranen einen innerhalb von 15% gleichen Carriergehalt.

4. DISKUSSION

Zur chemischen Synthese von Peptiden und Gewinnung von Anti-Peptid-Antikörpern als Reagentien für die Untersuchung der Struktur des Lactose:H^+-Carriers aus *E.coli* wurden der Amino- und Carboxyterminus, sowie der breite hydrophile Bereich zwischen Position 125 und 144 aus der Aminosäuresequenz des Carriers ausgewählt. Amino- und Carboxyterminus bilden in Hydrophilizitätsprofilen des Carriers (Abb. 4 und 6, Seite 9 bzw. 37) kurze hydrophile Abschnitte in unmittelbarer Nachbarschaft zu jeweils etwa 20 Aminosäurereste langen, hydrophoben Bereichen, die die Membran vermutlich als α-Helix überqueren. Die C-terminalen 12 Aminosäuren sind mit dem benachbarten hydrophoben Abschnitt durch die Sequenz Gly-Pro-Gly-Pro verbunden, die - als eine Art Gelenk - die Flexibilität des C-Terminus' erhöhen sollte. Die N-terminalen 8 Aminosäuren des Carriers können, wie Experimente mit β-Galactosidase/Lactose:H^+-Carrier-Fusionsproteinen (109,110) zeigten, durch unterschiedlich lange Teile der β-Galactosidase ersetzt werden, ohne daß die Funktion des Carriers völlig verloren geht. Beide Termini des Carriers stellen daher gute Kandidaten für antigene Stellen dieses Proteins dar.

Im Bereich um Aminosäure 135 liegen das Hydrophilizitätsmaximum des Lactose:H^+-Carriers (Abb.4 und 6, Seite 9 bzw. 37) und nach Sekundärstrukturvorhersage (111) zwei mögliche β-Turns (38). Dieser Abschnitt könnte daher in Form einer hydrophilen Schleife an der Oberfläche des Membranproteins von der wässrigen Phase aus für Antikörper zugänglich sein. Nach dem von Beyreuther (2) vorgeschlagenen Modell für die Struktur des Lactose:H^+-Carriers, das unter anderem auf der Beobachtung basiert, daß der in nicht-ionischen Detergentien solubilisierte Carrier weder an Kationen- noch an Anionenaustauscher bindet, sollen die Aminosäurereste 130 bis 140 die Membran jedoch überspannen und die in diesem Bereich gehäuft auftretenden geladenen Reste deshalb im Innern des Proteins verborgen sein. In diesem Fall sollten die

beiden Enden dieses Bereichs um Aminosäure 128 bzw. 142 auf den beiden entgegengesetzten Seiten der Membran exponiert sein. Deshalb wurden aus diesem Abschnitt der Aminosäuresequenz des Carriers drei überlappende Peptide mit 11-13 Aminosäureresten synthetisiert ($P_{125-135}$, $P_{130-140}$, $P_{132-144}$).

Die Peptide wurden nach der Festphasenmethode (60,61) synthetisiert, an Hämocyanin gekoppelt und mit den Kopplungsprodukten Kaninchen immunisiert. Mit allen synthetisierten Peptiden konnten Antiseren erhalten werden, die hohe Titer im ELISA gegen die freien Peptide aufwiesen.

Der C-Terminus des Carriers liegt auf der cytoplasmatischen Seite der Membran.

Die Antiseren gegen den synthetischen C-Terminus, das Decapeptid $P_{408-417}$, zeigten eine starke und spezifische Reaktion mit dem Lactose:H^+-Carrier in Immunoblot und Immunpräzipitation, und nahezu alle Antikörper, die das synthetische Peptid erkannten, reagierten auch mit dem membrangebundenen Carrier (vergl. Abschn. 3.3.1.3.). Die Bindung der radiojodierten Anti-C-Terminus-Antikörper an invertierte *E.coli*-Membranvesikel ("inside-out"-Vesikel), nicht jedoch an Vesikel mit nativer Orientierung ("right-side-out"-Vesikel), zeigte, daß der C-Terminus des Carriers auf der dem Zellinnern zugewandten Seite der Cytoplasmamembran lokalisiert ist.

Diese Ergebnisse bestätigen die Richtigkeit der aus Nukleotidsequenz des *lacY*-Gens abgeleiteten C-terminalen Aminosäuresequenz des Lactose:H^+-Carriers. Sie zeigen, daß der Carrier asymmetrisch in die Cytoplasmamembran eingebaut ist, und schließen somit Modelle aus, die den Carrier als Oligomer mit antiparallel orientierten Untereinheiten beschreiben.

Anti-C-Terminus-Antikörper ermöglichen eine Quantifizierung des Carriers auch in Mutanten.

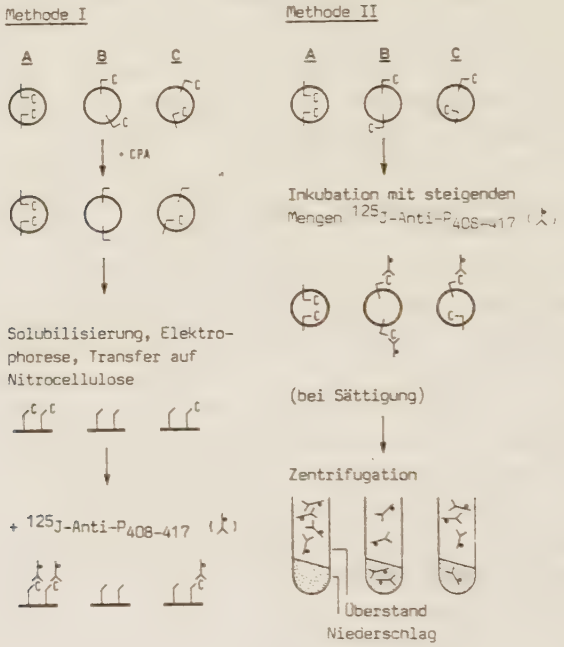
Während bei der Immunisierung mit dem gereinigten Lactose:H^+-Carrier bevorzugt Antikörper gegen in geringem Ausmaß in der Carrierpräparation enthaltene Verunreinigungen erhalten werden, stellen die Antikörper gegen den synthetischen C-Terminus des Carriers ein monospezifisches, hochaffines Reagens für das Protein dar. Sie ermöglichen die quantitative Bestimmung des Proteins mit großer Empfindlichkeit in *E.coli*-Wildtypstämmen und in Mutanten, bei denen aufgrund veränderter kinetischer Eigenschaften des Carriers seine Quantifizierung durch Aktivitätsbestimmung nicht möglich ist. Dies konnte am Beispiel der *lacY*-Mutante X71-54 (106,107,137) gezeigt werden, für die ein im Vergleich zum isogenen Wildtypstamm unveränderter Carrierspiegel gefunden wurde (vergl. Abschn. 3.4.2.3.). Zusammen mit kinetischen Messungen ermöglichte dies die Erklärung des beobachteten Phänotyps dieser Mutante, der nicht, wie zuvor postuliert (106, 107,137), auf einer Entkopplung von Galactosid- und Protonentransport, sondern auf einer für verschiedene Substrate unterschiedlichen Veränderung der Translokationsraten des Carriers beruht (112).

Der Vergleich von quantitativer Immunpräzipitation (vergl. Abschn. 3.4.2.1.) des Lactose:H^+-Carriers durch das Anti-C-Terminus-Antiserum aus solubilisierten Membranen des Carrier-Überproduzenten T206 (1,03 nmol/mg Rohmembranprotein) mit der Aktivitätsbestimmung durch Substratbindung (1,1 nmol/mg) bestätigt die Stöchiometrie von einer Substratbindungsstelle je Carrier-Polypeptidkette (24).

Der Carrier wird bei der Rekonstitution in Proteoliposomen in beiden Orientierungen eingebaut.

Durch die kombinierte Anwendung von Anti-C-Terminus-Antikörpern und Carboxypeptidase A konnte die Orientierung

des Lactose:H^+-Carriers in verschiedenen *E.coli*-Membranpräparationen und in rekonstitutierten Proteoliposomen bestimmt werden (vergl. Abschn. 3.4.1.). Dazu wurden zwei komplementäre Methoden entwickelt (94):



In Methode I werden die auf der Außenseite der Vesikel exponierten Carrier-C-Termini mit Carboxypeptidase entfernt und die übrig bleibenden C-Termini im Immunoblot mit Hilfe der Anti-Peptid-Antikörper quantifiziert; diese Methode mißt die im Innern der Vesikel unzugänglichen C-Termini. Dagegen werden in Methode II die auf der Außenseite von Vesikeln mit bekanntem Carriergehalt exponierten Carrier-C-Termini direkt gemessen.

Mit beiden Methoden wurden übereinstimmende Ergebnisse erzielt (94): In *E.coli*-Sphäroblasten und in durch osmotische Lyse von Sphäroblasten frisch präparierten Mem-

branvesikeln nach Kaback (92) ist der C-Terminus des Carriers von außen für Carboxypeptidase oder Antikörper unzugänglich, während in French-Press-Vesikeln und in allen beschallten Membranvesikeln mehr als 95% der Carrier-C-Termini für Carboxypeptidase zugänglich sind. Diese "inside-out"-Topologie wird auch nach längerem Beschallen oder Einfrieren und Auftauen beibehalten und ist möglicherweise durch eine auf der Innenseite der Cytoplasmamembran höhere Proteinkonzentration bedingt, so daß diese Seite in den beim Beschallen entstehenden kleineren Vesikeln die größere zur Verfügung stehende Oberfläche, also die Außenseite einnimmt. Mit beiden Methoden konnte gezeigt werden, daß nach Solubilisierung des Lactose:H^+-Carriers mit Dodecylmaltosid oder Octylglucosid+Lipid und Rekonstitution des Carriers in Proteoliposomen nur 40-60% der C-Termini auf der Außenseite der Proteoliposomen zugänglich sind; dies bedeutet, daß der Carrier bei der Rekonstitution in beiden möglichen Orientierungen in etwa gleichem Ausmaß in die Proteoliposomen eingebaut wird. Da für den Galactosidtransport durch den gereinigten und in Proteoliposomen rekonstituierten Lactose:H^+-Carrier nahezu gleiche kinetische Konstanten gemessen wurden wie in "right-side-out"-Vesikeln nach Kaback (24,113), bestätigen diese Ergebnisse die symmetrische Funktionsweise des Carriers.

Mit den beschriebenen Resultaten zur Orientierung des Carriers in rekonstituierten Proteoliposomen qualitativ übereinstimmende Ergebnisse wurden von Carrasco et al. (114) beschrieben. Sie verglichen die Bindung eines monoklonalen Antikörpers, der ein Epitop des Carriers auf der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran erkennt,und von Antikörpern gegen ein synthetisches C-terminales Dodecapeptid an carrierhaltige rekonstituierte Proteoliposomen und fanden beide Epitope in gleichem Ausmaß zugänglich. Eine quantitative Analyse deutete darauf hin, daß b e i d e Epitope auf a l l e n in den Proteoliposomen enthaltenen Carriermolekülen zugänglich sind. Die Autoren postulierten daher eine quantitative intramolekulare Umorientierung des Carrier-C-

Terminus' bei der Rekonstitution in Proteoliposomen, ohne daß die Funktion des Proteins dadurch beeinträchtigt würde. Vermutlich beruht dieses, von den hier beschriebenen Versuchen abweichende Ergebnis auf Fehlern bei der Quantifizierung des Carriers und/oder der Antikörper.

Antikörper gegen $P_{125-135}$ reagieren mit dem Carrier

Auch Antikörper gegen das Undecapeptid $P_{125-135}$ reagierten mit dem Lactose:H^+-Carrier im Immunoblot (vergl. Abschn. 3.3.2.). Allerdings mußten affinitätschromatographisch gereinigte peptidspezifische Antikörper eingesetzt werden, damit sich die spezifische Reaktion mit dem Carrier vom Hintergrund der unspezifischen Bindung an andere Proteine auf dem Immunoblot abhob, und auch unter diesen Bedingungen banden nur etwa 0,1% der peptidspezifischen Antikörper an den Carrier. Nach der Synthese des Lactose:H^+-Carriers in einem zellfreien Transkriptions-Translations-System mit dem *lacY* enthaltenden Plasmid pGW2 als Matrize konnte das Transportprotein mit affinitätschromatographisch gereinigtem Anti-$P_{125-135}$-IgG ebenso immunpräzipitiert werden wie mit Anti-$P_{125-135}$-Serum (vergl. 101). Dagegen war eine spezifische Präzipitation des aus *E.coli*-Membranen solubilisierten Carriers nicht nachzuweisen. Ebensowenig konnte eine spezifische Bindung ^{125}J-markierter Anti-$P_{125-135}$-Antikörper an carrierhaltige Membranvesikel beobachtet werden. Möglicherweise ist zumindest ein Teil der in zellfreiem System synthetisierten Carriermoleküle nicht korrekt gefaltet, so daß in diesen Molekülen der von den Anti-$P_{125-135}$-Antikörpern erkannte Abschnitt der Polypeptidkette für die Antikörper besser zugänglich ist als in nativen, aus *E.coli*-Membranen solubilisierten Protein.

Aufgrund der fehlenden Reaktivität der Anti-$P_{125-135}$-Antikörper mit dem membrangebundenen Carrier war ein direkter Nachweis der Lokalisierung des entsprechenden Abschnitts der Sequenz des Carriers in der Cytoplasmamembran nicht mög-

lich. Allerdings ging durch Behandlung von carrierhaltigen beschallten, daher invertierten, *E.coli*-Membranvesikeln mit der Endoprotease Thermolysin - nicht jedoch bei entsprechender Behandlung von "right-side-out"-Vesikeln - im anschließenden Immunoblot die Bindung von Anti-$P_{125-135}$-Antikörpern an die charakteristische Carrierbande (M_r= 33000) verloren, ohne daß eine neue Antikörper bindende Bande bei kleinerem Molekulargewicht beobachtet wurde. Damit ist eine Lokalisierung der Aminosäurereste 125-135 des Carriers auf der cytoplasmatischen Seite der *E.coli*-Cytoplasmamembran zumindest sehr wahrscheinlich. Da ebenfalls in invertierten Vesikeln proteolytische Spaltstellen des Carriers bei Aminosäure 142 und 144 durch Sequenzierung der an Cys_{148} ^{35}S-markierten Fragmente lokalisiert werden konnten (B. Bieseler, pers. Mitteilung), scheint der hydrophile Bereich des Carriers zwischen Aminosäure 125 und 145 in der *E.coli*-Cytoplasmamembran dem Zellinnern zugewandt zu sein und nicht, wie von Beyreuther vorgeschlagen (2), die Membran zu überspannen.

Die antigene Struktur des Carriers begründet die Grenzen der Reaktivität von Anti-Peptid-Antikörpern mit dem Protein.

Unter den Antikörpern gegen die übrigen synthetischen Peptide (P_{1-9}, $P_{130-140}$, $P_{132-144}$) konnte, auch nach affinitätschromatographischer Isolierung des peptidspezifischen IgG, nur für das gegen $P_{130-140}$ gerichtete IgG eine schwache Bindung an den Lactose:H^+-Carrier nachgewiesen werden. Auch Antikörper gegen zwei weitere von T. Möröy (101) synthetisierte, hydrophile Abschnitte des Carriers, die Peptide P_{34-45} und $P_{284-291}$, zeigten keine Reaktion mit dem Lactose:H^+-Carrier. Tabelle 9 faßt die Reaktivität aller Anti-Peptid-Antikörper mit dem Lactose:H^+-Carrier zusammen :

Tabelle 9 :

Reaktivität der peptidspezifischen Antikörper			
gegen	mit dem Peptid (ELISA)	mit dem Lactose:H^+-Carrier im Immunoblot	in der Membran
P_{1-9}	++	-	n.b.
P_{34-45}	++	-	n.b.
$P_{125-135}$	+++	++	-
$P_{130-140}$	++	+	n.b.
$P_{132-144}$	+	-	n.b.
$P_{284-291}$	++	-	n.b.
$P_{408-417}$	++++	++++	++++

(n.b.: nicht bestimmt)

Antikörper gegen ein chemisch synthetisiertes lineares Peptid erkennen nicht die Aminosäuresequenz, sondern eine dreidimensionale Struktur, also eine bestimmte Konformation dieses Peptids. Eine Kreuzreaktion von solchen Anti-Peptid-Antikörpern mit einem Protein, in dessen Aminosäuresequenz die Sequenz des entsprechenden Peptids enthalten ist, ist daher nur zu erwarten, wenn die Konformation dieses Abschnitts im intakten Protein auch vom freien Peptid in Lösung bzw. gekoppelt an das immunogene Trägerprotein eingenommen wird, oder wenn der entsprechende Abschnitt des Proteins eine so hohe Flexibilität aufweist, daß sich seine Konformation der Antigenbindungsstelle von Anti-Peptid-Antikörpern anpassen kann und so eine hochaffine Antigen-Antikörper-Bindung möglich wird (48).

Von N- und C-terminalen Enden der Polypeptidkette eines Proteins kann solche Flexibilität am ehesten erwartet werden,und tatsächlich waren in den meisten Fällen, in denen bislang Antikörper gegen synthetische Peptide als

Reagentien für intakte Proteine erfolgreich eingesetzt wurden, diese Antikörper gegen die Carboxy- oder Aminotermini der Proteine gerichtet (115-128).

Auch unter den Antikörpern gegen die synthetischen Abschnitte aus der Aminosäuresequenz des Lactose:H^+-Carriers zeigten die Anti-C-Terminus-Antikörper die mit Abstand beste Reaktivität mit dem Carrier. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß auch bei der Immunisierung mit dem gereinigten Lactose:H^+-Carrier der C-Terminus des Proteins das immunodominante Epitop darstellt: In den Seren von mehr als der Hälfte der Tiere, die Antikörper gegen den gereinigten Carrier produzierten, waren ausschließlich Antikörper gegen den C-Terminus nachzuweisen (94,101,129). Daß die Antikörper gegen den synthetischen N-Terminus des Carriers nicht mit dem Protein reagierten, könnte auf die nicht ideale Präsentation des Peptids bei der Immunisierung zurückzuführen sein: Nur gegen das durch Glutaraldehyd und diazotiertes Benzidin an das immunogene Trägerprotein gekoppelte Peptid konnte eine Immunantwort erzielt werden, während die für die Präsentation des Peptids ideale Kopplung über seinen Carboxyterminus nur an Polylysin gelang und dieses Konjugat eine sehr geringe Immunogenität aufwies . Allerdings wurde im bisher einzigen weiteren Fall, in dem Anti-Peptid-Antikörper zur Bestimmung der Orientierung eines integralen Membranproteins verwendet wurden (125), Antikörper gegen ein mit Glutaraldehyd gekoppeltes, N-terminales Peptid aus der Aminosäuresequenz des Low-Density-Lipoprotein-Rezeptors aus Fibroblasten erfolgreich eingesetzt. Deshalb erscheint es eher wahrscheinlich, daß der Aminoterminus des Latose:H^+-Carriers, dessen Hydrophilizitätsindex (98) auch nur dem für den Carrier ermittelten Durchschnittswert entspricht, zwar an der Membranoberfläche lokalisiert, aber in seiner Beweglichkeit stark eingeschränkt ist und möglicherweise zum Teil in die Membran eintaucht.

Die Reaktivität von Antikörpern gegen chemisch synthe-

tisierte interne Abschnitte der Aminosäuresequenz eines Proteins wurde bisher nur für ein Protein systematisch untersucht: das Influenza-Virus-Hämagglutinin (55). In diesem Fall wurde für den größten Teil der Anti-Peptid-Seren Antikörperbindung an das auf Plastikoberfläche immobilisierte Protein gemessen. Allerdings besitzt das Hämagglutinin eine ungewöhnliche, langgestreckte Struktur (130), so daß nur ein sehr geringer Teil der Polypeptidkette im Innern des Proteins lokalisiert und damit für Antikörper unzugänglich ist. Erfahrungen mit Anti-Peptid-Antikörpern gegen interne Abschnitte eines integralen Membranproteins, die nach Sekundärstrukturvorhersagen als hydrophile Schleifen zwei hydrophobe, membranüberspannende α-Helices verbinden sollen, liegen bisher nicht vor. Unter den Anti-Peptid-Antikörpern gegen solche, chemisch synthetisierte, postulierte Schleifen des Lactose:H^+-Carriers reagierten nur Antikörper gegen $P_{125-135}$ und $P_{130-140}$, zwei überlappende Sequenzen aus dem längsten hydrophilen Abschnitt der Aminosäuresequenz des Carriers, mit dem Protein. Diese beiden Peptide zeigten auch als einzige eine, wenn auch sehr schwache Bindung an Antikörper gegen den mit Carboxypeptidase behandelten, gereinigten Carrier.

Damit stimmt überein, daß es bisher nicht gelang, den von monoklonalen Antikörpern gegen den Lactose:H^+-Carrier (45) erkannten Epitopen Abschnitte der Sequenz des Carriers zuzuordnen (131). Der bislang am besten charaktisierte Antikörper 4B1, der im Gegensatz zu den Anti-C-Terminus-Antikörpern den aktiven Transport durch den Carrier hemmt, bindet weder an chemisch synthetisierte Abschnitte der Carrier-Aminosäuresequenz noch an durch BrCN-Spaltung erzeugte Fragmente des Proteins, scheint also ein diskontinuierliches Epitop auf dem Carrier zu erkennen. Ähnliche Ergebnisse werden für monoklonale Antikörper gegen andere bakterielle Membranproteine beschrieben (132).

Die meisten hydrophilen Abschnitte der Aminosäuresequenz des Carriers scheinen also im intakten Protein ent-

weder von der wässrigen Phase aus unzugänglich oder in einer Konformation fixiert zu sein, die nicht mit einer vom freien Peptid angenommenen Sekundärstruktur übereinstimmt. Diese Konformation bleibt auch dann weitgehend erhalten, wenn der Carrier mit Dodecylsulfat aufgelöst und nach Gelelektrophorese auf Nitrocellulose transferiert wird: Die durch Raman-Spektroskopie ermittelten Sekundärstrukturen des Lactose:H^+-Carriers in Membranen, nicht-ionischen Detergentien und in Dodecylsulfat sind nahezu identisch (37).

Peptidspezifische Antikörper liefern einen Beitrag zu einem Modell für die Struktur des Lactose:H^+-Carriers

Physikalisch-chemische Untersuchungen, die einen sehr hohen α-Helix-Gehalt des Carriers nachwiesen, haben ein Modell für die Sekundärstruktur des Carriers sehr wahrscheinlich gemacht, in dem der größte Teil der Polypeptidkette in α-helicalen Abschnitten organisiert ist, die die Membran in Zick-Zack-Form überspannen (Abb.24). Für die N- und C-terminalen Bereiche der Polypeptidkette, die in etwa 20 Aminosäurereste lange, sehr hydrophobe Abschnitte gegliedert sind (vergl. Abb.4, Seite 9), ergeben sich die Grenzen der membranüberquerenden α-Helices aus dem Hydropathieprofil der Aminosäuresequenz. Dagegen zeigt dieses Profil für den hydrophileren Bereich der Polypeptidkette zwischen Aminosäure 180 und 350 keine derart klare Gliederung. Dieser Bereich kann nur in α-helicale Abschnitte gegliedert sein, wenn diese jeweils mehrere Ladungen enthalten.

Daß dieser hydrophile Bereich des Proteins an der Galactosidbindung beteiligt ist, zeigten genetische Studien (133-135). Im für diesen Teil des Proteins codierenden Bereich des *lacY*-Gens sind eine Reihe von Mutationen lokalisiert worden, durch die die Affinität des Carriers für Galactoside beeinträchtigt wird (133). Eine dieser Mutationen, die die Spezifität des Carriers ändert, so daß

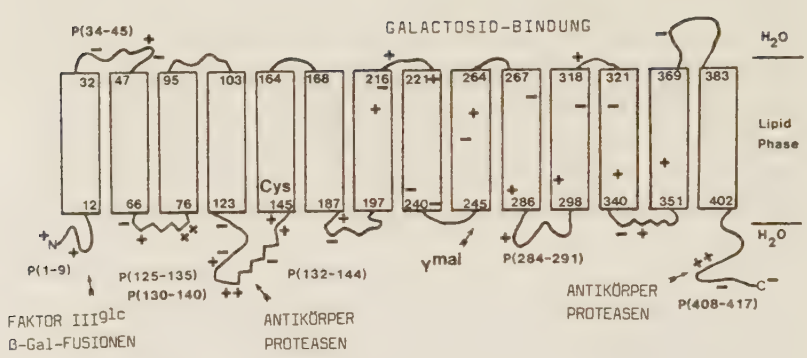


Abb.24 : Mögliche Struktur des Lactose:H^+-Carriers

Die Abbildung faßt bekannte Daten zur Struktur des Carriers zusammen (Erläuterungen siehe Text).

dieser Maltose statt Lactose transportiert (y^{mal}), ist eine Punktmutation im Codon 266 des *lacY*-Gens ($Thr_{266} \rightarrow Ile_{266}$). Dagegen beeinträchtigt eine Mutation, die einen geladenen Aminosäurerest in die erste N-terminale postulierte α-Helix einführt ($Gly_{24} \rightarrow Arg_{24}$) die Transportfunktion des Carriers, nicht aber seine Fähigkeit zur Galactosidbindung (59).

Die N-terminalen acht Aminosäuren des Carriers scheinen dagegen für die Transportfunktion weniger wichtig zu sein. Eine aus einer *lacY*-Mutante mit drei Aminosäuresubstitutionen im N-terminalen Bereich des Carriers entstandene Revertante zeigt Wildtypeigenschaften, obwohl zwei im extremen N-Terminus des Carriers liegende Aminosäuresubstitutionen erhalten blieben (59). Fusionsproteine, in denen die N-terminalen acht Aminosäuren des Carriers durch Teile der β-Galactosidase ersetzt sind, zeigen eine zumin-

dest teilweise erhaltene Carrierfunktion (109,110). Allerdings scheint der N-Terminus an der Interaktion des Carriers mit dem Faktor III^{glc} des Phosphotransferase-Systems beteiligt zu sein, dessen Bindung an den Lactose:H^+-Carrier eine Rolle bei der Regulation des Lactosetransports in *E.coli* spielt (136). Diese Beobachtungen und die differentielle, durch Lactoseperoxidase katalysierte Radiojodierung des Carrier-N-Terminus' in Vesikeln unterschiedlicher Orientierung (B. Bieseler, pers. Mitteilung) bestätigen die in Abbildung 24 dargestellte Lokalisierung des N-Terminus' auf der cytoplasmatischen Seite der Membran.

Die in der vorliegen Arbeit beschriebenen Versuche mit peptidspezifischen Antikörpern zeigten, daß auch der C-Terminus des Carriers dem Zellinnern zugewandt ist, und bestätigten die durch das Strukturmodell postulierte Lokalisierung des Bereichs um Aminosäure 130 des Carriers auf der cytoplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran von *E.coli*.

Die in Abbildung 24 dargestellte, aufgrund der Aminosäuresequenz des Carriers mit Hilfe von Sekundärstruktur-Vorhersage-Methoden postulierte Faltung der Polypeptidkette konnte damit für die N- und C-terminalen Teile des Proteins bestätigt werden. Ob auch der Bereich zwischen Aminosäure 180 und 350, wie in Abbildung 24 dargestellt, in α-Helices organisiert ist und wo die Grenzen dieser Helices liegen, bleibt eine offene Frage. Zwar liegen in diesem Abschnitt der Carrier-Polypeptidkette weitere proteolytische Spaltstellen, jedoch wird die Bestimmung der Lokalisierung einzelner hydrophiler Bereiche des Carriers durch Proteasespaltung in Vesikeln unterschiedlicher Topologie dadurch erschwert, daß die "inside-out"-Orientierung von *E.coli*-Membranvesikeln thermodynamisch offenbar stark bevorzugt ist - wie mit Hilfe der Anti-C-Terminus-Antikörper gezeigt werden konnte - und es deshalb nicht auszuschließen ist, daß "right-side-out"-Vesikel ihre Orientierung während der Protease-Behandlung verändern. Möglicherweise könnte die modifizierte Anwendung von Protease und

Anti-Peptid-Antikörpern weitere Aufschlüsse liefern: Da der C-Terminus des Carriers die proteolyseempfindlichste Stelle des Proteins darstellt, sollten nach Protease-Behandlung von rekonstituierten Proteoliposomen, in denen der Carrier in beiden möglichen Orientierungen eingebaut ist, im anschließenden Immunoblot mit den Anti-C-Terminus-Antikörpern nur solche Carrierfragmente sichtbar werden, deren C-Terminus auf der Innenseite der Proteoliposomen geschützt lag. Auf diese Weise könnten Protease-Spaltstellen auf der periplasmatischen Seite des Carriers lokalisiert werden.

Aufschluß über die dreidimensionale Anordnung der membranüberspannenden Abschnitte des Proteins wird jedoch wohl erst die Analyse von zwei- oder dreidimensionalen Kristallen des Carriers geben. Um eine Kristallisierung dieses Membranproteins, von dem offenbar nur sehr kleine Teile in die wässrige Phase ragen, zu erleichtern, könnte der Carrier mit einem einheitlichen, hochmolekularen Reagens konjugiert werden. Diese Rolle könnten monoklonale Antikörper gegen den C-Terminus des Carriers erfüllen, die aufgrund der Immunodomonanz dieses Epitops leicht zu gewinnen sein sollten.

5. LITERATURVERZEICHNIS

1 "Membranes and Transport", Vol.2, A.N.Martonosi (Hrsg.), Plenum Press, New York (1982)

2 K.Beyreuther, B.Müller-Hill, P.Overath & J.K.Wright (1982): Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 363, 1409-1414

3 H.R.Kaback (1983): J.Membrane Biol. 76, 95-112

4 P.Overath & J.K.Wright (1980): Ann.N.Y.Acad.Sci. 358, 292-306

5 P.Overath & J.K.Wright (1983): Trends Biochem.Sci. 8, 404-408

6 T.H.Wilson & D.M.Wilson (1983): in "Cell Membranes, Methods and Reviews", Vol.1, E.Elliot, W.Frazier, L.Glaser (Hrsg.), Plenum Press, New York, Seite 1-39

7 H.V.Rickenberg, G.N.Cohen, G.Buttin & J.Monod (1956): Ann.Inst. Pasteur Paris 91, 829-857

8 G.Rudnick, S.Schuldiner & H.R.Kaback (1976): Biochemistry 15, 5126-31

9 P.Overath, R.M.Teather, R.D.Simoni, G.Aichele & U.Wilhelm (1979): Biochemistry 18, 1-11

10 J.K.Wright, H.Schwarz, E.Straub & P.Overath (1982): Eur.J.Biochem. 124, 545-552

11 J.K.Wright, R.M.Teather & P.Overath (1983): Meth.Enzymol. 97, 158-175

12 P.Mitchell (1963): Biochem.Soc.Symp. 22, 142-168

13 P.Mitchell (1976): Biochem.Soc.Trans. 4, 399-430

14 J.C.West (1970): Biochem.Biophys.Res.Comm. 41, 655-661

15 C.F.Fox & E.P.Kennedy (1965): Proc.Natl.Acad.Sci. USA 54, 891-899

16 R.M.Teather, B.Müller-Hill, U.Abrutsch, G.Aichele & P.Overath (1978): Mol.Gen.Genet. 159, 239-248

17 R.M.Teather, J.Bramhill, I.Riede, J.K.Wright, M.Fürst, G.Aichele, U.Wilhelm & P.Overath (1980): Eur.J.Biochem. 108, 223-231

18 F.Jacob & J.Monod (1961): J.Mol.Biol. 3, 318-356

19 W.Gilbert & B.Müller-Hill (1966): Proc.Natl.Acad.Sci. USA 56, 1891-1898

20 G.Zubay, D.Schwartz & J.Beckwith (1970): Proc.Natl.Acad.Sci. USA 66, 104-110

21 M.J.Newman & T.H.Wilson (1980): J.Biol.Chem. 255, 10583-10586

22 M.J.Newman, D.L.Foster, T.H.Wilson & H.R.Kaback (1981): J.Biol. Chem. 256, 11804-11808

23 D.L.Foster, M.L.Garcia, M.J.Newman, L.Patel & H.R.Kaback (1982): Biochemistry 21, 5634-5638

24 J.K.Wright & P.Overath (1984): Eur,J,Biochem. 138, 497-508

25 J.K.Wright (1984): Biochim.Biophys.Acta, zur Publ. einger.

26 J.K.Wright, I.Riede, P.Overath (1981): Biochemistry 20, 6404-6415

27 M.Bentaboulet, A.Kepes (1981): Eur.J.Biochem. 117, 233-238

28 I.Yamato & J.P.Rosenbusch (1983): FEBS Lett. 151, 102-104

29 M.G.P.Page & I.C.West (1981): Biochem.J. 196, 721-731

30 P.Viitanen, M.L.Garcia & H.R.Kaback (1984): Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81, 1629-1633

31 D.E.Büchel, B.Gronenborn & B.Müller-Hill (1980): Nature 283, 541-545

32 T.H.D.Jones & E.P.Kennedy (1969): J.Biol.Chem. 244, 5981-5987

33 R.Ehring, K.Beyreuther, J.K.Wright & P.Overath (1980): Nature 283, 537-540

34 K.Beyreuther, R.Ehring, P.Overath & J.K.Wright (1980): in "Methods in Peptide and Protein Sequence Analysis", C.Bird (Hrsg.), Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, Seite 199-212

35 B.König & H.Sandermann (1982): FEBS Lett. 147, 31-34

36 K.Dornmair (1984): Diplomarbeit, Universität Tübingen

37 H.Vogel & F.Jähnig, zur Publ. einger.

38 D.L.Foster, M.Boublik & H.R.Kaback (1983): J.Biol.Chem. 258, 31-34

39 R.Henderson & P.N.T.Unwin (1975): Nature 257, 28-32

40 J.Kyte & R.F.Doolittle (1982): J.Mol.Biol. 157, 105-132

41 K.Beyreuther, B.Bieseler, R.Ehring & B.Müller-Hill (1981): in "Methods in Protein Sequence Analysis", M.Elzija (Hrsg.), Humana Press, Clifton, NJ , Seite 139-148

42 H.Mitchell (1983): Trends Biochem.Sci. 8, 56-59

43 R.M.Garavito , J.A.Jenkins, J.N.Jansonius, R.Karlsson & J.P. Rosenbusch (1983): J.Mol.Biol. 165, 313-327

44 G.Köhler & C.Milstein (1976): Eur.J.Immunol. 6, 511-519

45 N.Carrasco, S.M.Tahara, L.Patel, T.Goldkorn & H.R.Kaback (1982): Proc.Natl.Acad.Sci. USA 79, 5894-5898

46 J.Eash & M.R.Villarejo (1983): Arch.Biochem.Biophys. 220, 495-501

47 J.G.Sutcliffe, T.M.Shinnick, N.Green & R.A.Lerner (1983): Science 219, 660-666

48 G.Walter & R.F.Doolittle (1983): in "Genetic Engeneering", Vol.5, J.K.Setlow, A.Hollaender (Hrsg.), Plenum Press, New York, Seite 61-91

49 M.J.Crumpton (1974): in "The Antigens", M.Sela (Hrsg.), Academic Press, New York

50 P.E.E.Todd, I.J.East & S.J.Leach (1982): Trends Biochem.Sci. 7, 212-216

51 C.-L.Lee & M.Z.Atassi (1976): Biochem.J. 159, 89-93

52 R.A.Lerner (1982): Nature 299, 592-596

53 R.Arnon, E.Maron, M.Sela & C.B.Anfinsen (1971): Proc.Natl.Acad. Sci.USA 68, 1450-1455

54 M.Z.Atassi (1975): Immunochemistry 12, 423-438

55 N.Green, H.Alexander, A.Olson, S.Alexander, T.M.Shinnick, J.G. Sutcliffe & R.A.Lerner (1982): Cell 28, 477-487

56 E.P.Kennedy, M.K.Rumley & J.B.Armstrong (1974): J.Biol.Chem. 249, 33-37

57 H.H.Winkler & T.H.Wilson (1966): J.Biol.Chem. 241, 2200-2211

58 K.A.Devor, R.M.Teather, M.Brenner, H.Schwarz, H.Würz & P.Overath (1976): Eur.J.Biochem. 63, 459-467

59 U.Weigel (1984): Dissertation, Universität Tübingen

60 R.B.Merrifield (1963): J.Am.Chem.Soc. 82, 2149-2154

61 G.Barany & R.B.Merrifield (1980): in "The Peptides", Vol.2, E. Gross, J.Meienhofer (Hrsg.), Academic Press, New York

62 J.M.Stewart & J.D.Young (1979): "Solid Phase Peptide Synthesis", Freeman, San Francisco

63 M.Itoh, D.Hagiwara & T.Kamya (1977): Bull.Chem.Soc.Japan 50, 718-721

64 M.Itoh, D.Hagiwara & T.Kamya (1975): Tetrahedron Lett., 4395

65 B.F.Gisin (1973): Helv.Chim.Acta 56, 1476

66 B.F.Gisin (1972): Analyt.Chim.Acta 58, 248

67 E.Kaiser, R.Colescott, C.D.Bossinger & P.J.Cook (1970): Analyt. Biochem. 34, 595-598

68 M.K.Anwer & A.F.Spatola (1980): Synthesis, 929-932

69 M.Reichlin (1980): Methods Enzymol. 70, 159-165

70 V.Likhite & A.Sehon (1967): in "Methods in Immunology and Immunochemistry", Vol.1, C.A.Williams, M.W.Chase (Hrsg.), Academic Press, New York, Seite 164-165

71 T.L.Goodfriend, L.Levine & G.D.Fasman (1964): Science 144, 1344-1346

72 L.Hudson & F.C.Hay (1980): "Practical Immunology", 2.Ausg., Blackwell, Oxford

73 R.R.Porter (1959): Biochem.J. 73, 119-126

74 "Handbook of Experimental Immunology", D.M.Weir (Hrsg.), 3.Aufl., Blackwell Scientific Publ., Oxford (1978)

75 "Affinity Chromatography, Principles and Methods", Pharmacia Fine Chemicals (1979)

76 L.A.Cohen (1974): Methods Enzymol. 34, 102-108

77 L.A.Herzenberg & L.A.Herzenberg (1978): in (74), S. 12.21-12.22

78 J.W.Halliday (1982): Methods Enzymol. 84, 148-171

79 W.M.Hunter & F.C.Greenwood (1962): Nature 194, 495-496

80 M.B.Wilson & P.K.Nakane (1978): in "Immunofluorescence and Related Staining Techniques", W.Knapp, K.Holubor & G.Wick (Hrsg.) Elsevier, Amsterdam, S.215

81 D.M.Boorsma & J.G.Streefkerk (1979): J.Immunol.Methods 30, 245-255

82 A.Voller, D.E.Bidwell & A.Barlett (1976): Bull.WHO 53, 55-65

83 E.Engvall (1980): Methods Enzymol. 70, 419-439

84 U.K.Lämmli (1970): Nature 227, 680-685

85 H.Towbin, T.Stähelin & J.Gordon (1979): Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 4350-4354

86 W.N.Burnett (1981): Analyt.Biochem. 112, 195-203

87 B.Batteiger, W.J.Newhall V & R.B.Jones (1982): J.Immunol.Methods 55, 297-307

88 R.Hawkes, E.Niday & J.Gordon (1982): Analyt.Biochem. 119, 142-147

89 M.S.Blake, K.H.Johnston, G.J.Russell-Jones & E.C.Gottschlich (1984): Analyt.Biochem 136, 175-179

90 S.W.Kessler (1981): Methods Enzymol. 73, 442-471

91 M.K.Skinner & M.D.Griswold (1983): Biochem.J. 209, 281-284

92 H.R.Kaback 1971): Methods Enzymol. 22, 99-120

93 R.M.Teather, O.Hamelin, H.Schwarz & P.Overath (1977): Biochem. Biophys.Acta 467, 386-395

94 R.Seckler & J.K.Wright (1984): Eur.J.Biochem. 142, 269-279

95 M.J.Osborn, J.E.Gander, E.Parisi & J.Carson (1972): J.Biol.Chem. 247, 3962-3972

96 O.H.Lowry, N.J.Rosebrough, A.L.Farr & R.J.Randall (1951): J.Biol. Chem. 193, 265-275

97 G.L.Peterson (1977): Analyt.Biochem. 83, 346-356

98 T.P.Hopp & K.R.Woods (1981): Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 3824-3828

99 T.P.Hopp (1984): Molecular Immunol. 21, 13-16

100 P.Owen & H.R.Kaback (1979): Biochemistry 18, 1422-1426

101 T.Möröy (1984): Diplomarbeit, Universität Tübingen

102 G.Zubay, G.A.Chambers & L.C. Cheong (1970): in "The Lactose Operon", J.R.Beckwith & D.Zipser (Hrsg), Cold Spring Harbour Laboratory, New York, S.375-391

103 T.Goldkorn, G.Rimon, E.S.Kempner & H.R.Kaback (1983): Proc.Natl. Acad.Sci.USA 81, 1021-1025

104 G.Scatchard (1949): Ann.N.Y.Acad.Sci. 51, 660-672

105 P.T.S.Wong, E.R.Kashket & T.H.Wilson (1970): Proc.Natl.Acad.Sc. USA 65, 63-69

106 I.C.West & T.H.Wilson (1973): Biochem.Biophys.Res.Comm. 50, 551-558

107 D.Seto-Young, S.Bedu & T.H.Wilson 1984): J.Membrane Biol. 79, 185-193

108 A.C.Hobson, D.Gho & B.Müller-Hill (1977): J.Bactariol. 131, 830-838

109 H.Bocklage & B.Müller-Hill (1983): Eur.J.Biochem. 137, 561-565

110 H.W.Grießer, B.Müller-Hill & P.Overath (1983): Eur.J.Biochem. 137, 567-572

111 P.Y.Chou & G.Fasman (1973): J.Mol.Biol. 74, 263-281

112 J.K.Wright & R.Seckler, zur Publikation eingereicht

113 P.Viitanen, M.L.Garcia & H.R.Kaback (1984): Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81, 1629-1633

114 N.Carrasco, D.Herzlinger, R.Mitchell, S.DeChiara, W.Danho, T.F. Gabriel & H.R.Kaback (1984): Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81, 4672-4676

115 G.Walter, K.H.Scheidtmann, A.Carbone, A.P.Laudano & R.F.Doolittle (1980): Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77, 5197-5200

116 J.Papkoff, M.H.-T.Lai, T.Hunter & I.M.Verma (1981): Cell 27, 109-119

117 G.Walter, M.A.Hutchinson, T.Hunter & W.Eckhart (1981): Proc.Natl. Acad.Sci.USA 78, 4882-4886

118 M.H.Baron & D.Baltimore (1982): Cell 28, 395-404

119 B.L.Semler, C.W.Anderson, R.Hanecak, L.F.Dorner & E.Wimmer (1982): Cell 28, 405-412

120 R.Harvey, R.Faulkes, P.Gillet, N.Lindsay, E.Paucha, A.Bradburg & A.E.Smith (1982): EMBO J. 1, 473-477

121 E.A.Nigg, B.M.Sefton, T.Hunter, G.Walter & S.J.Singer (1982): Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79, 5322-5326

122 P.A.Kibersitis, A.Pessi, E.Atherton, R.Jackson, T.Hunter & D. Zimmern (1983): FEBS Lett. 164, 355-360

123 D.R.Roop, C.K.Cheng, L.Titterington, C.A.Meyers, J.R.Stanley, P.M.Steinert & S.H.Yuspa (1984): J.Biol.Chem. 259, 8037-8040

124 T.Bunte, P.Donner, E.Pfaff, B.Reis, I.Greiser-Wilke, H.Schaller & K.Moelling (1984): EMBO J. 3, 1919-1924

125 W.J.Schneider, C.J.Slaughter, J.L.Goldstein, R.J.W.Anderson, D. Capra & M.S.Brown (1983): J.Cell Biol. 97, 1635-1640

126 E.A.Worobec, A.K.Taneja, R.S.Hodges & W.Paranchych (1983): J. Bacteriol. 153, 955-961

127 A.R.Neurath, S.B.H.Kent, N.Strick (1984): Science 224, 392-395

128 R.Schlegel & M.Wache (1984): J.Biol.Chem. 259, 4691-4694

129 R.Seckler, J.K.Wright & P.Overath (1983): J.Biol. Chem. 258, 10817-10820

130 I.A.Wilson, J.J.Skehel & D.C.Wiley (1981): Nature 289, 366-373

131 D.Herzlinger, P.Viitanen, N.Carrasco & H.R.Kaback (1984): Biochemistry 23, 3688-3693

132 J.Gabay, S.Schenkmann, C.Desaymard & M.Schwartz (1984): in "Monoclonal Antibodies Against Bacteria", A.J.L.Macario & E.C.Macario (Hrsg.), Academic Press, New York

133 M.Mieschendahl, D.Büchel, H.Bocklage & B.Müller-Hill (1981): Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78, 7652-7656

134 J.K.Wright, K.Dornmair, S.Mitaku, T.Möröy, J.M.Neuhaus, R.Seckler, H.Vogel, U.Weigel, F.Jähnig & P.Overath (1984): Ann.N.Y.Acad.Sci. im Druck

135 M.Markgraf, H.Bocklage & B.Müller-Hill (1984): Mol.Gen.Genet., im Druck

136 S.D.Nelson, J.K.Wright & P.W.Postma (1983): EMBO J. 2, 715-720

137 T.H.Wilson, M.Kusch, E.R.Kashket (1970): Biochem.Biophys.Res. Comm. 40, 1409-1414

Lebenslauf

ROBERT SECKLER

17.April 1954	geboren in Baden-Baden; Vater: Reinhold Seckler, Maschinenschlosser; Mutter: Asta, geb.Krieg, Verwaltungsangestellte
April 1961	Einschulung, Grundschule B.-Baden-West
27.April 1965	Eintritt ins mat.-nat. Markgraf Ludwig-Gymnasium, Baden-Baden
29.Mai 1973	Abitur am Markgraf Ludwig-Gymnasium
1.Oktober 1973 - 31.März 1974	Tätigkeit am Max-Planck-Institut für Virusforschung, Tübingen
April 1974	Immatrikulation an der Universität Tübingen für das Studium der Biochemie
Mai 1980	mündliche Diplomprüfung
Juni 1980 - Mai 1981	Diplomarbeit am Physiol.-Chem. Institut mit dem Thema "Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen zur Struktur des Pyruvatdehydrogenasekomplexes aus *E.coli*"
Mai 1981 - August 1982	Zivildienst an der Medizinischen Universitätsklinik, Tübingen
September 1982 - August 1984	Dissertation "Antikörper gegen synthetische Peptide als Sonden für die Struktur des Lactose:H^+-Carriers aus *E.coli*", angefertigt am Max-Planck-Institut für Biologie, Tübingen, unter Anleitung von Prof.Dr.P.Overath

Meine akademischen Lehrer an der Universität Tübingen waren die Professoren und Dozenten :

A.Anderer, E.Bayer, H.Bisswanger, V.Braun, W.Braun, K. Eisele, U.Feine, F.Gönnenwein, K.G.Grell, H.Günzl, J. Guglielmi, H.Hagenmaier, G.Jung, E.Kallee, E.Lindner, H.Mauser, D.Mecke, H.Metzner, G.F.Meyer, K.D.Mörike, E.Müller, W.Nakel, H.Ninnemann, H.Oberhammer, P.Overath, E.Pfaff, H.Pommer, H.Probst, H.D.Schlumberger, W.Seyffert, W.Voelter, U.Weber, G.Weitzel, A.Wendel, U.Weser, H. Zähner und W.Zeil.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353